

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 221**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2005 E 05754219 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1765397**

54 Título: **Anticuerpos inhibidores que se unen al complejo del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA y su receptor (uPAR))**

30 Prioridad:

**25.05.2004 US 573896 P**

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

**14.03.2013**

73 Titular/es:

**TACTIC PHARMA, LLC (100.0%)  
1007 Church Street, Suite 307  
Evanston 60201 , US**

72 Inventor/es:

**PARRY, GRAHAM, C. y  
MAZAR, ANDREW P.**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 398 221 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 inhibidores que se unen al complejo del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA y su receptor (uPAR)

5

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10

[0001] La presente invención, en el campo de la bioquímica, la inmunología y la medicina, se refiere a anticuerpos ("Abs") u otros ligandos específicos para (a) los complejos binarios uPA-uPAR, (b) los complejos ternarios incluyendo uPA-uPAR y (c) los complejos de uPAR y proteínas que no sean uPA, tales como integrinas. Estos ligandos Abs o no Ab inhiben la interacción de uPA y uPAR con moléculas adicionales con las que los complejos anteriores interactúan. Tales ligandos Abs u otros no Ab se usan en métodos de diagnóstico y terapéuticos, particularmente contra el cáncer.

15

Descripción del estado de la técnica

20

[0002] Un cuerpo significativo de evidencia a partir de estudios *in vitro* e *in vivo* ha establecido que el sistema del activador del plasminógeno de uroquinasa (uPA) es fundamental para el proceso de metástasis, haciéndolo un objetivo prometedor para el desarrollo de fármacos contra el cáncer (Mazar, AP et al. (1999) *Angiogenesis* 3: 15-32). Además de uPA, su receptor de superficie de célula (uPAR) es un objetivo adecuado para el diseño y desarrollo de agentes de diagnóstico y terapéuticos del cáncer (Mazar, AP (2001) *Anti- Cancer Drugs* 12: 397-400) porque:

25

(a) uPAR se expresa selectivamente en células tumorales metastásicas y células endoteliales angiogénicas ("ECs"), pero no en otras células;

(b) uPAR es un participante importante en diferentes recorridos intracelulares y extracelulares requeridos para la metástasis que son actualmente el objetivo de intensos esfuerzos de desarrollo de fármacos; y

30

(c) es posible interferir en diferentes puntos a lo largo del recorrido uPA.

Así, uPA y uPAR son objetivos prometedores para el desarrollo de diagnósticos y tratamientos útiles contra diferentes tipos de tumores/cánceres.

35

El sistema uPA/uPAR y el cáncer

40

[0003] La metástasis y la angiogénesis comparten muchas características funcionales comunes que caracterizan los procesos invasivos y migratorios de las células tumorales y ECs. Estas características incluyen (1) la sobrerregulación de proteasa y la expresión de integrina, (2) la pérdida de los contactos célula-célula y célula-matriz, (3) la receptividad aumentada para el crecimiento y los factores de diferenciación, y (4) la remodelación de la matriz extracelular (ECM) y la membrana basal (BasM). Todos esto contribuye a la progresión tumoral.

45

[0004] El "sistema" uPA, que incluye la serina proteasa uPA, su receptor uPAR y su inhibidor de serpina específico, activador plasminógeno tipo inhibidor 1 (PAI-1), desempeña un papel fundamental en muchas de estas actividades. La actividad de este sistema es responsable de:

(1) el inicio de cataratas que provocan la activación de plasminógeno activando diferentes pro-metaloproteasas (proMMPs),

50

(2) la liberación y el procesamiento de factores de crecimiento latente tales como factor-2 de crecimiento de fibroblasto (FGF-2), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocito (HGF), y factor- $\beta$  de crecimiento de transformación (TGF $\beta$ ),

55

(3) (a) las interacciones con componentes del ECM tales como vitronectina (Vn) y fibronectina (Fn); (b) las interacciones directas con diferentes integrinas incluidas  $\alpha 5 \beta 1$  y  $\alpha v \beta 3$ , y (c) la remodelación de BasM y ECM para promover la motilidad celular.

Además, el sistema uPA puede también iniciar la producción de fibrina localizada que puede desempeñar un papel en la angiogénesis.

60

[0005] La expresión de uPA y uPAR se ha demostrado en numerosos tipos de tumores, incluyendo glioblastoma, carcinoma de próstata, pecho, colon, hepatocelular y de células renales. (Mizukami IF et al. (1994) *Clin Immunol and Immunopathol* 71:96-104; Hsu DW et al., (1995) *Am J Pathol* 147:114-23; de Witte JH et al. (1999) *Br J Cancer* 79:1190-8). La expresión de uPA y uPAR es típicamente superior en formas más agresivas de la enfermedad. En células tumorales, esta expresión suele ser superior en el frente invasivo del tumor. (Buo, L et al., (1995) *Human Pathol* 26:1133-1138; Yamamoto M et al. (1994) *Cancer Res* 54:5016-5020). La fuerte coloración inmunohistoquímica de

65

uPAR en los vasos sanguíneos asociada al frente invasivo de carcinomas celulares de pecho, colon y renales se ha dado a conocer (Bastholm L et al. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 7: 39-47; Nakata S et al. (1998) *Int. J. Cancer* 79:179-186). En el estudio del carcinoma de colon, uPAR se colocó con VEGF. La expresión de uPA y uPAR también se ha observado en macrófagos asociados a tumores en diferentes tipos de tumores (Ohtani H et al. (1995) *Int J Cancer* 62:691-6; Xu Y et al. (1997) *Hum Pathol* 28:206-13). El uPA es quimiotáctico para monocitos y media tanto la adhesión como la migración de estas células. La adhesión y la migración requieren sólo la ocupación de uPAR pero no la actividad catalítica de uPA. Así, el sistema uPA se cree que contribuye a la progresión tumoral actuando en múltiples tipos de célula asociada a tumores.

[0006] Varios estudios recientes han evaluado el potencial terapéutico de la inhibición de la unión de uPA a uPAR en sistemas singénicos. La entrega de un fragmento aminoterminal murino codificado por adenovirus de uPA (abreviado "ATF" por sus siglas en inglés - este es el dominio de uPA que contiene la región de unión a uPAR) directamente en tumores dio como resultado (a) la supresión de la neovascularización y (b) la detención del crecimiento tumoral (Li H et al. (1998) *Gene Ther* 5:1105-1113). Debido a la "especificidad" de especies, el ATF murino se esperaba que sólo se enlazara a ECs huéspedes murinas y leucocitos, no a células tumorales humanas. Esto indica que la inhibición tumoral se medió a través de la supresión de la respuesta angiogénica huésped. Finalmente, un estudio colaborativo entre algunos de los presentes inventores y S. Rabbani y J. Gladu ha demostrado recientemente que un Ab policlonal se puso en contra de un fragmento de 100-residuos de uPAR de rata selectivamente localizado para un tumor de pecho de rata que creció a partir de células de la línea celular de Mat BIII (Rabbani SA et al. (2002) *Cancer Res* 62:2390-97). Este anticuerpo policlonal inhibió completamente el crecimiento del tumor y llevó a la regresión tumoral.

[0007] Luther et al. describen anticuerpos monoclonales contra uPAR para el análisis de la expresión de antígeno de uPAR en tumores humanos malignos por métodos inmunológicos (Luther et al. (1997) *Am. J. Pathol.* 150:1231-1244). Específicamente, Luther et al. divulga el anticuerpo monoclonal IIIB11 que se enlaza a residuos de aminoácidos 125-132 de dominio II de uPAR.

[0008] Rabbani y Gladu ([2002] *Cancer Research* 62:2390-2397) revelan la capacidad de un anticuerpo policlonal contra el dominio de NH<sub>2</sub>-terminal enlazando ligandos de rata uPAR para reducir el volumen tumoral en ratones.

[0009] Desafortunadamente, a pesar de la promesa de enfocar el sistema uPA para propósitos terapéuticos y de diagnóstico, los esfuerzos de investigación no han dado como resultado el desarrollo de agentes adecuados para la clínica. Los accesos a moléculas pequeñas se han visto obstaculizados por (1) la dificultad de inhibir potentemente una interacción de proteína-proteína (p. ej., uPA-uPAR o uPAR-integrina), y (2) la falta de direcciones adecuadas o información estructural susceptible de esfuerzos de química medicinal. Diferentes inhibidores de péptido potentes de la interacción uPA-uPAR se han identificado pero estos padecerían las propiedades farmacológicas típicamente pobres de los péptidos y no han demostrado los niveles de actividad requeridos ni en ensayos basados en células (Ploug M et al. (2001) *Biochemistry* 40:12157-68).

#### Resumen de la invención

[0010] Los presentes inventores produjeron un conjunto de anticuerpos monoclonales (mAbs) que enlazan con complejos uPA-uPAR y que inhiben su interacción con objetivos aguas abajo tales como integrinas. Tal inhibición se espera que inhiba el crecimiento tumoral y la metástasis. Estos mAbs pueden tener utilidad como anticuerpos "desnudos" así como para agentes terapéuticos de reconocimiento y agentes de formación de imágenes para tumores. Diferentes anticuerpos que apuntan a uPAR son eficaces en modelos animales de crecimiento canceroso (el modelo de cáncer ovárico A2780 y el modelo de cáncer pulmonar A549). Los epítomos reconocidos por estos mAbs son regiones peptídicas dentro de uPAR. Por lo tanto, los péptidos uPAR correspondientes a estas regiones o derivados de ellas son útiles como antagonistas de interacciones uPAR con proteínas aguas abajo.

[0011] Es habitual que las células tumorales malignas y las ECs angiogénicas tomen una ventaja selectiva en el proceso de migración e invasividad celular. Esta ventaja es el resultado, al menos en parte, de la expresión de las células de las moléculas uPAR en su superficie, y estas moléculas uPAR se saturan por unión del ligando producido endógenamente, uPA.

[0012] Así, mAbs, péptidos u otras entidades químicas que tienen como objetivo y preferiblemente inhiben las interacciones uPA-uPAR con objetivos aguas abajo son útiles en el tratamiento y/o diagnóstico del cáncer. Los ligandos de uPA-uPAR preferidos aguas abajo, o de uPAR solo, incluyen integrinas, proteína relacionada con receptor (LRP, por sus siglas en inglés) de lipoproteína de baja densidad así como otros socios de enlace. Algunos de estos ligandos aguas abajo pueden mediar la señalización, la migración y/o la invasión celular.

[0013] Los presentes inventores han producido y estudiado un mAb, ATN-658, que específicamente enlaza con el uPAR ocupado por ligando y de este modo sirve como molécula ejemplar que puede enlazar con uPAR independientemente de la presencia de ligandos. El mAb puede detectar tanto el uPAR desocupado como el ocupado en un tumor u otro tejido enfermo donde el sistema uPA desempeña un papel en la patobiología. Los Abs u otros ligandos no Ab preferidos son aquellos que no enlazan con el sitio de enlace de uPA de uPAR.

[0014] Los presentes inventores han identificado los epítomos a los que se enlazan estos Abs. Tales péptidos o péptidos sintéticos o naturales o derivados peptídicos que retienen la estructura 3D de estos epítomos son útiles como agentes de diagnóstico y/o terapéuticos. Aquí se describen varias secuencias peptídicas identificadas sobre la base de estos epítomos.

[0015] Además, los presentes inventores han desarrollado un método para identificar Abs que imiten las características de ATN-658. Este método se puede usar para desarrollar mAbs humanizados o completamente humanos que reconozcan y enlacen con los mismos epítomos que aquellos enlazados por ATN-658. Tales imitaciones de ATN-658, que tiene una actividad antitumoral particularmente robusta, se incluyen aquí como agentes de diagnóstico y/o terapéuticos.

[0016] La presente divulgación además describe macromoléculas, incluyendo Abs, fragmentos de unión al antígeno tales como Abs de cadena única (=scFv), polipéptidos y péptidos no Ab, aptámeros, etc., así como moléculas orgánicas pequeñas, que tienen la propiedad de unión a uPAR sin inhibir la unión de uPA. Algunas de estas moléculas interfieren con interacciones aguas abajo bien de uPA-uPAR bien de uPAR solo.

[0017] Además de las composiciones específicas que apuntan a interacciones uPA-uPAR, esta divulgación describe métodos para la detección de Abs que enlazan exclusivamente con uPA-uPAR o que inhiben interacciones aguas abajo de uPAR. Así, la divulgación describe un método para identificación estas moléculas que enlazan con el complejo uPA-uPAR. Este método se puede variar para detectar moléculas que enlazan otros componentes o complejos del sistema uPA/uPAR. Por ejemplo, uPA atado a su inhibidor natural PAI-1 también se enlaza a uPAR, formando un complejo ternario uPA:PAI-1/uPAR. Un método de la presente divulgación comprende el uso de tales complejos ternarios para cribar ligandos que interactúan sólo con este complejo pero no con el complejo binario uPA:PAI o uPA-uPAR. Otro método se refiere a inhibidores que interfieren con la interacción de los complejos ternarios con objetivos aguas abajo tales como LRP.

[0018] Este método es adecuado para identificar moléculas de ligando que se internalizan cuando se unen al complejo.

[0019] Además, esta descripción describe métodos para detectar una molécula que enlaza con el complejo uPA-uPAR (pero no con uPA o uPAR no complejo) o para detectar inhibidores que interfieren con la unión de uPA-uPAR o uPAR con objetivos aguas abajo así como los mismos ligandos de unión. Tales ligandos pueden ser Abs, otras proteínas, péptidos, aptámeros, moléculas pequeñas, etc. Una forma de realización específica de este tipo sería un ligando uPA-uPAR o uPAR que interfirió con el ensamblaje mediante uPAR de Fn o que perturbó la unión de Fn o de fragmentos Fn para la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Las alteraciones del ensamblaje de otros componentes matriciales (por ejemplo, vitronectina) también se describen en esta divulgación.

[0020] Esta divulgación también describe métodos para identificar inhibidores de activación plasminógena que no inhiben la actividad catalítica de uPA y composiciones nuevas que tienen esta actividad.

[0021] Más específicamente, la presente invención se refiere a un ligando que enlaza con un complejo uPA-uPAR binario, este ligando sustancialmente no enlazan con (a) uPA libre o (b) la región de uPAR que reconoce y enlaza con uPA, de modo que el ligando no inhibe la unión uPA-uPAR.

[0022] Otra forma de realización comprende un ligando que enlaza con un complejo ternario de uPA-uPAR y una molécula adicional (X), tal como PAI-1, este ligando:

(a) se enlaza con un complejo uPA-uPAR-X,

(b) no se enlazan sustancialmente con cualquiera de los siguientes: (i) un complejo uPA-X, (ii) la región de reconocimiento de uPA y la región de unión de uPA de uPAR o de X, (iii) uPA libre, o (iv) X libre; y

(c) no inhibe sustancialmente la unión uPA-uPAR o la unión uPA-X.

[0023] El ligando anterior es un mAb, o un fragmento de unión de antígeno del mismo. Los mAbs preferidos son mAbs quiméricos humanizados o humanos.

[0024] En una forma de realización, un mAb o fragmento de unión del antígeno preferido comprende:

(a) una cadena  $V_L$  que incluye tres CDRs que tienen las secuencias de aminoácidos respectivas SEQ ID n°: 3, SEQ ID n°: 4 y SEQ ID n° 5 y

(b) una cadena  $V_H$  que incluye tres CDRs que tienen las secuencias de aminoácidos respectivas SEQ ID n°: 6, SEQ ID n°: 7 y SEQ ID n°: 8.

[0025] Un mAb o fragmento de unión de antígeno más preferido, como más arriba, incluye:

(a) una cadena  $V_L$  con la secuencia SEQ ID n° 1 y

(b) una cadena  $V_H$  con la secuencia SEQ ID n°: 2.

5

[0026] En una forma de realización, el ligando anterior es un ligando que inhibe la unión de complejos uPA-uPAR con otro ligando biológico para estos complejos. Ejemplos de "otros ligandos biológicos" incluyen integrinas, preferiblemente  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ , o  $\alpha 4\beta 1$ .

10

[0027] El ligando anterior puede ser un ligando que inhibe e interfiere con (a) un ensamblaje mediado por uPAR de Fn, (b) una unión de Fn o un fragmento de la misma para integrina  $\alpha 5\beta 1$ , o (c) el ensamblaje de componentes  $V_n$ .

15

[0028] En una forma de realización preferida, el ligando anterior (a) se marca diagnósticamente (con una etiqueta detectable); o (b) se marca, conjuga o funde con (en el caso de un polipéptido) una fracción terapéuticamente activa, que hace al ligando terapéuticamente activo.

[0029] Aquí se proporciona una composición de diagnóstico que incluye (a) el ligando diagnósticamente marcado como en el párrafo anterior; y (b) un portador diagnósticamente aceptable.

20

[0030] En la composición de diagnóstico el ligando se marca preferiblemente con un radionucleido, un agente imprimible en PET, un agente imprimible en MRI, un agente fluorescente, un fluorógeno, un cromóforo, un cromógeno, un fosforizador, un quimioluminisador o un bioluminisador. Los radionúclidos preferidos se seleccionan del grupo que consisten en  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{61}\text{Gn}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{12}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{169}\text{Yb}$  y  $^{201}\text{Tl}$ . Los fluoroscedores o fluorógenos preferidos son fluoresceína, rodamina, dansilo, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-fitaldehído, fluorescamina, un derivado de fluoresceína, verde de Oregón, verde de rodamina, verde de rodol y rojo de Texas.

25

[0031] La presente invención proporciona una antiangiogenia terapéutica o composición farmacéutica anti-tumoral que inhibe la angiogénesis indeseada, el crecimiento tumoral y/o la metástasis tumoral incluyendo (a) una cantidad eficaz del ligando terapéuticamente activo anterior y (b) un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición está preferiblemente en una forma adecuada para la inyección. La fracción terapéuticamente activa se puede conjugar directamente o unir indirectamente al ligando. Una fracción terapéutica preferida es un fármaco quimioterapéutico, una toxina o un radionucleido terapéutico (preferiblemente  $^4\text{Sc}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{10}\text{Pd}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  o  $^{217}\text{Bi}$ ).

30

35

[0032] En la anterior composición terapéutica, la fracción terapéuticamente activa puede ser un péptido o polipéptido, por ejemplo, una toxina que se funde al ligando.

40

[0033] Esta invención se refiere a un método *in vitro* para la inhibición de la migración celular, invasión celular, proliferación celular o angiogénesis, o para inducir la apoptosis, incluyendo contactar células asociadas con migración, invasión, proliferación o angiogénesis celular indeseada con una cantidad eficaz del ligando terapéuticamente activo anterior.

45

[0034] También se incluye un uso médico para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o condición caracterizada por angiogénesis indeseada, crecimiento tumoral y/o metástasis tumoral que incluye la administración al sujeto de una cantidad eficaz de la composición terapéutica farmacéutica anterior.

[0035] También se describe un método de ensayo para la detección en una muestra de una sustancia sospechosa de tener las propiedades aglutinantes del ligando anterior, incluyendo:

50

(a) poner en contacto la muestra con complejos uPA-uPAR y determinar la unión de un componente de la muestra con los complejos;

(b) poner en contacto la muestra con uPAR libre y determinar la unión de un componente de la muestra con el uPAR.

55

(c) comparar la unión de (a) y (b),

donde la presencia de unión en (a) y una ausencia sustancial o significativamente inferior de unión en (b) es indicativa de la presencia de la sustancia en la muestra.

60

[0036] El ensayo puede ser un ensayo de enlace competitivo que usa un socio de enlace marcado que se enlaza con complejos uPA-uPAR, donde la sustancia de la muestra compete para enlazar con el socio de enlace.

65

[0037] Una forma de realización es un método de ensayo para detectar en una muestra una sustancia sospechosa de tener las propiedades aglutinantes del ligando anterior, incluyendo:

(a) poner en contacto la muestra con complejos uPA-uPAR-X (con X definido como anteriormente) y determinar la unión de un componente de la muestra con los complejos;

5 (b) poner en contacto la muestra con uno o más (i) complejos uPA:X; (ii) complejos uPA-uPAR; o (iii) X no complejo, y determinar la unión de un componente de la muestra con uPA-X, uPA-uPAR o X;

(c) comparar la unión de (a) y (b),

10 donde la presencia de unión en (a) y una ausencia sustancial o significativamente inferior de unión en (b) es indicativa de la presencia de la sustancia en la muestra.

[0038] En el método anterior, los complejos puede estar en una superficie celular.

15 [0039] La descripción describe un método de ensayo para identificar un Ab u otro ligando que enlace con el mismo epítipo como lo hace mAb ATN-658 incluyendo la medición de la capacidad de una prueba sospechosa de contener el Ab u otro ligando para inhibir competitivamente la unión de ATN-658 detectablemente marcado con (i) suPAR inmovilizado, (ii) D2D3 de suPAR inmovilizado o (iii) un fragmento inmovilizado de suPAR o D2D3 de suPAR, donde la inhibición competitiva de al menos aproximadamente el 20%, preferiblemente el 50%, más preferiblemente el 70% y más preferiblemente el 90%, indica que un anticuerpo o ligando se enlaza al mismo epítipo.

20 [0040] Una forma de realización es un método para identificar un péptido reconocido por (a) ATN-658 o (b) un Ab u otro ligando que tenga la misma especificidad de unión que ATN-658, este método incluye la medición de la capacidad que tienen una prueba sospechosa de contener el péptido, o un péptido candidato, para inhibir competitivamente la unión de ATN-658 detectablemente marcado o el Ab u otro ligando con la misma especificidad de enlace, con (i) suPAR inmovilizado, (ii) D2D3 de suPAR inmovilizado o (iii) un fragmento inmovilizado de suPAR o D2D3 de suPAR, donde la inhibición competitiva de al menos aproximadamente el 20%, preferiblemente el 50%, más preferiblemente el 70% y más preferiblemente el 90%, indica que el péptido tiene la especificidad de enlace.

30 [0041] En la presente se describe un ensayo para seleccionar un compuesto, o para determinar si un compuesto candidato tiene esencialmente las mismas características de unión con una estructura de uPAR que ATN-658, incluyendo la medición de la capacidad de una muestra que se selecciona o el compuesto candidato para inhibir competitivamente la unión de ATN-658 detectablemente marcado con (i) suPAR inmovilizado, (ii) D2D3 de suPAR inmovilizado o (iii) un fragmento inmovilizado de suPAR o D2D3 de suPAR, donde la inhibición competitiva de al menos aproximadamente el 20%, preferiblemente el 50%, más preferiblemente el 70% y más preferiblemente el 90%, indica que el péptido tiene las características de unión.

40 [0042] En una forma de realización del ensayo precedente, el compuesto que se selecciona, o el compuesto candidato, es una molécula orgánica pequeña con una masa molecular entre aproximadamente 50 Da y aproximadamente 2500 Da. En otra forma de realización, el compuesto que se selecciona, o el compuesto candidato, es una molécula de ácido nucleico, preferiblemente un oligonucleótido, tal como una molécula de RNAi o un aptámero.

Breve descripción de los dibujos

45 [0043]

Figura 1. Análisis SDS-PAGE de ATF y fragmentos de suPAR expresados en células S2. ATF (aa 1-143) y suPAR (aa 1- 279) fueron clonados y expresados en células S2 Schneider de Drosophila. Las células se indujeron para expresar proteínas recombinantes con cobre (0,5 nM) durante 7 días. Se recogieron sobrenadantes de cultivo y se clarificaron por centrifugado y filtración. Después de añadir inhibidores de proteasa las proteínas se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose, pH 7,5, (ATF) o SP-Sepharose, pH 8,8, (suPAR). ATF y suPAR se purificaron posteriormente mediante RP-HPLC. El suPAR recombinante purificado fue digerido con quimiotripsina para generar el fragmento de dominio2/dominio3 (D2D3) soluble. Antes de la inmunización, la proteína de D2D3 se conjugó con la hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) de la proteína portadora.

55 Figura 2. ATN-658 se enlaza con un mutante no-glicosilado de suPAR, indicando que ATN-658 se dirige contra un epítipo peptídico (no un carbohidrato), como la mayoría de los demás mAbs anti-uPAR.

60 Figura 3. Técnicas de transferencia de Western con dos mAbs de anti-D2D3, ATN-615 y ATN-658. Se resolvieron proteínas recombinantes por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se evaluaron con anticuerpos purificados (5 µg/ml). ATN-615 y ATN-658 reconocen específicamente suPA y D2D3.

65 Figura 4. Anticuerpos Anti-D2D3 inhiben la migración inducida por uPA. La migración de células CHO expresando uPAR hacia uPA (500 nM) se determinó usando un ensayo de cámara de Boyden modificado. Los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 5$ , anti uPAR, y anti- D2D3 inhiben la migración, sugiriendo que integrina  $\alpha 5 \beta 1$  y uPAR son críticos para migración inducida por uPA.

Figura 5. ATN-658 <sup>125</sup>I-etiquetado se enlaza con las células HeLa con afinidad alta. Las monocapas confluyentes de células HeLa se incubaron en placas de 24-pocillos con concentraciones en aumento de [<sup>125</sup>I]-ATN-658 a temperatura ambiente durante una hora. Las células se lavaron extensivamente con PBS/Tween-20 y se solubilizó el material enlazado con 1 M NaOH. La unión inespecífica se determinó en presencia de un exceso de 100 veces de Ab no marcado.

La figura 6 muestra que el mAb ATN-658 no concurre con la unión de uPA a células HeLa. La unión de ATN-658 a células HeLa no inhibió la unión de <sup>125</sup>I-scuPA. Las células HeLa se incubaron con 5nM <sup>125</sup>I-scuPA en presencia o ausencia de bien 300nM scuPA no marcado bien 300nM ATN-658. ATN-617, un mAb anti-uPAR que bloquea la unión de uPA a uPAR aparece para concurrir con la unión de scuPA.

La figura 7 muestra que ATN-658 inhibe el crecimiento tumoral en el modelo de cáncer ovárico A2780 tan eficazmente como la cisplatina. Las células A2780 expresan sólo uPAR y no uPA.

La figura 8 muestra que ATN-658 inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de cáncer pulmonar (célula no pequeña) A549 en el que 10<sup>6</sup> células tumorales fueron inoculadas. Las células de A549 expresan tanto uPA como uPAR.

La figura 9 muestra que ATN-658 biotinilado se enlaza saturablemente con suPAR.

Las figuras 10A y 10B muestran los resultados de un ensayo de competición utilizando ATN-658 etiquetado de biotina para identificar mAbs que reconocen el mismo epítipo en suPAR. ATN-616 y ATN-617 son anticuerpos de anti-uPAR que bloquean la unión de uPA a uPAR. ATN-616 se enlaza específicamente a uPAR ocupado por ligando.

Descripción de las formas de realización preferidas

[0044] Los presentes inventores han descubierto que los mAbs, péptidos u otras entidades químicas que se apuntan al complejo uPA/uPAR o al complejo uPAR-integrina son útiles en el tratamiento y/o diagnóstico del cáncer. Hasta la fecha, los presentes inventores creen que no se ha descrito ningún anticuerpo que reconozca el complejo uPA-uPAR pero no (a) uPAR o uPA individualmente o (b) uPAR en presencia de uPA (es decir, uPAR ocupado por ligando).

[0045] Además, el complejo uPA-uPAR o uPAR solo tienen otros ligandos "aguas abajo" tales como integrinas, proteína relacionada con el receptor (LRP) de lipoproteínica de baja densidad y otros socios de unión. Estas interacciones aguas abajo se cree que son importantes para los procesos de migración, invasión y proliferación celular. Por lo tanto, es deseable que los procesos se dirijan a estos procesos terapéuticamente o detecten el proceso o sus componentes de interacción diagnósticamente.

[0046] Además de anticuerpos específicos que tienen como objetivo estas interacciones, como se describirá con más detalle más adelante, esta divulgación también describe métodos para detectar anticuerpos que enlazan exclusivamente con el complejo uPA-uPAR o que inhiben interacciones aguas abajo de uPAR.

El método de anticuerpos

[0047] Los presentes inventores han generado un panel de mAbs apuntando a uPAR. El uPAR es un objetivo ideal para los anticuerpos porque se expresa en la superficie celular. La expresión de uPAR en la interfaz tumor-vasculatura (en células tumorales invasivas, células endoteliales angiogénicas o macrófagos asociados a tumores) sugiere que los anticuerpos apuntando a esta proteína no padecerían las mismas barreras para la difusión que han llevado al fracaso de otros mAbs para entrar en tumores y servir como agentes de diagnóstico o ejercer efectos terapéuticos. De manera importante, uPAR no se expresa normalmente en tejidos inertes, lo que debería minimizar el potencial para toxicidad cuando se utiliza un Ab terapéutico y minimizar señales no-específicas (o falsos positivos) cuando se utiliza un Ab de diagnóstico.

[0048] Los presentes inventores han opuesto mAbs contra un fragmento de la forma soluble de uPAR (conocida como "suPAR") expresado en células S2 de Drosophila. En tales células, se expresa un isotipo de suPAR mínimamente glicosilado. El uso de este suPAR como inmunógeno está previsto que supere la unión heterogénea a uPAR observada con todos los demás mAbs examinados hasta la fecha. Los estudios realizados como parte de un taller sobre antígenos de leucocito compararon anticuerpos anti-uPAR disponibles en 1995-1996 y los encontraron todos específicos para epítopos de carbohidratos, no proteicos (Manupello, J. et al., (1996) Tiss. Antigens 48: 368.). De hecho, el uPAR expresado en tumores es altamente y heterogéneamente glicosilado, y el modelo de glicosilación y representación de diferentes isoformas cambia en respuesta a varias señales (Stoppelli MP et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 4939-4943). Así, los anticuerpos anti-uPAR dirigidos contra epítopos de carbohidrato es improbable que reconozcan todas las isoformas de uPAR y pueden indeseablemente reaccionar en cruce con otras estructuras de glicosilación de expresión de proteínas similares a las que están presentes en uPAR. El uso de S2 ha llevado a la identificación de mAbs que reconocen los epítopos de proteína dentro de suPAR (Fig. 2).

[0049] Los presentes inventores han producido clones estables que expresan grandes cantidades de suPAR al igual que fragmentos de dominio de suPAR. Los rendimientos típicos que utilizan estos sistemas de expresión son del orden de

25-50 mgs/L después de purificación (>95% puros). Así, los presentes inventores han mostrado que es posible expresar todos los componentes requeridos para la generación de los anticuerpos de la presente invención y diseñar ensayos para evaluarlos y caracterizarlos.

5 [0050] Se ha expresado una forma mutante de suPAR en la que todos los sitios de glicosilación se han mutado. Los clones murinos de mAb existentes se pueden humanizar o primatizar.

10 [0051] La capacidad de los presentes inventores para generar conformacionalmente fragmentos de dominio intactos de suPAR les ha permitido producir mAbs contra D1 aislado y D2D3 aislado (de suPAR). Un epítipo expuesto en el fragmento D2D3 de uPAR también se expone en completa longitud, uPAR intacto sólo después de la unión de uPA. Se ha demostrado que este epítipo es crucial para la actividad pro-migratoria de uPA (Andolfo A et al. (2002) Thromb Haemost 88:298-306). En consecuencia, los anticuerpos generados contra el fragmento D2D3 en el que ya está expuesto este epítipo, se espera que tengan actividad anti-migratoria. Esto se ha demostrado para mAb ATN-658.

15 [0052] Esta invención está dirigida, de este modo, en parte a un mAb que enlaza con un complejo binario uPA-uPAR, pero no sustancialmente con (a) uPA libre o (b) la región de uPAR que reconoce y se enlaza con uPA, de modo que el mAb no inhibe la unión uPA-uPAR, este mAb se produce mediante un proceso que incluye el paso inicial de inmunización de un mamífero, preferiblemente un ratón, con:

20 (a) un isotipo de suPAR mínimamente glicosilado expresado en células de *Drosophila*, o

(b) un mutante deglicosilado de suPAR en el que 4 o 5 sitios de glicosilación se han mutado.

25 Después de la inmunización utilizando protocolos estándar, se emplean técnicas convencionales para generar líneas celulares de hibridoma de los animales inmunizados y para generar mAbs con las propiedades deseadas. Los mAbs específicos para complejos uPA-uPAR teniendo propiedades adicionales o un tanto diferentes, como se describe aquí, se hacen de la misma manera usando los mismos nuevos antígenos de suPAR. Los mAbs hechos mediante este proceso pueden o no enlazar uPAR libre en solución.

30 [0053] Hay cinco sitios de glicosilación unidos a N en el uPAR de tipo salvaje: Asn<sup>52</sup> (en D1) Asn<sup>162</sup> y Asn<sup>172</sup> (en D2) y Asn<sup>200</sup> y Asn<sup>233</sup> (en D3). Estos cuatro sitios en D2 y D3 se mutan preferiblemente a Gln para generar un inmunógeno de suPAR deglicosilado preferido para aumentar los mAbs de la invención.

35 [0054] También se han generado mAbs Anti-D2D3 que reconocen uPAR en superficies celulares independientemente de si el uPAR está ocupado por uPA. Ya que un gran porcentaje de uPAR en tumores, de hecho, se une a uPA, los anticuerpos de esta especificidad son útiles como agentes de enfoque para fracciones de diagnóstico y terapéuticas. Además, en pacientes con cáncer, se observa frecuentemente que los tumores expresan uPAR que se divide por proteasas expresadas por estos mismos tumores, dejando un fragmento D2D3 residual todavía unido al tumor (Sier CF et al., Thromb Haemost. 2004,;91:403-11). Así, el enfoque exitoso de estos tumores requiere anticuerpos anti D2D3. Estos anticuerpos son también útiles para aplicaciones de formación de imágenes *in vivo*.

40 [0055] Los anticuerpos anti-D2D3 (y otros anticuerpos de la presente invención) se evalúan preferiblemente en modelos de tumor xenogénico, dos ejemplos preferidos de éstos son los modelos A2780 y A549 (descritos con más detalle más adelante).

45 Secuencias de aminoácidos de la región M variable de dos mAbs preferidos mAb ATN-658: secuencias de región variable

50 [0056] La secuencia de aminoácidos de consenso (código de letra única) de los polipéptidos de región variable de cadena ligera (LV) y de región variable de cadena pesada (VH) de mAb ATN-658 se muestran más adelante. Se obtuvo ADNc a partir de ARN total extraído del hibridoma expresando ATN-658 y las regiones variables se clonaron, amplificaron y secuenciaron mediante técnicas estándar. Se resaltan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) para cada región variable (cursiva, negrita, subrayado).

55 Proteína de consenso ATN-648 V<sub>L</sub> (SEQ ID n°: 1):

1 DIXLTQSPLT LSVTIGQPAS ISCK**KSSQSLL DSDGKTYL**NW LLQRPGQSPK  
51 RLIY**LVSKLD**SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYC**WOGTHFP**  
101 LTFGAGTKLE LKL

60

Proteína de consenso ATN-658 V<sub>H</sub> (SEQ ID n°: 2):

1 VQLQESGPEL VKTGASVKIS CKAS**GYSFTS YMH**WVKQSH GKSLEWIG**EI**  
51 **NPYGGASYN OKIKG**RATFT VDTSSRTAYM QFNLSLSEDS AVYYCAR**SIY**  
65 101 **GHSVLDY**WGQ GTT VTVS

TABLA 1: Características de CDRs de las cadenas L y H de ATN-658

CDR*	Nº de residuos	Secuencia <sup>1</sup>	SEQ ID nº:
CDR L1	16	KSSQSLLDSDGKTYLN	3
CDR L2	7	LVSKLDS	4
CDR L3	9	WQGTHFPLT	5
CDR H1	10	GYSFTSYMMH	6
CDR H2	17	EINPYNGGASYNQKIKG	7
CDR H3	10	SIYGHSVLDY	8

\*CDR-L1: primera CDR de la cadena L; CDR-H2: segunda CDR de la cadena H, etc.

- 5 [0057] Según la presente invención, un Ab o mAb, tiene "esencialmente las mismas características de unión al antígeno" que un mAb de referencia si demuestra un perfil de especificidad similar (p. ej., por comparación de rango), y tiene afinidad para el antígeno pertinente (p. ej., complejo uPA-uPAR) dentro de 1,5 órdenes de magnitud, más preferiblemente dentro de un orden de magnitud, del Ab de referencia.
- 10 [0058] Los anticuerpos se evalúan para actividad antiangiogénica directa en un modelo de tapón de Matrigel *in vivo*. Los anticuerpos radioiodinados se utilizan para comprobar la internalización de Ab utilizando en MDA células MB 231 que expresan tanto el receptor como el ligando. LA internalización de anticuerpos también se mide en presencia de complejos PAI-1:uPA.
- 15 Anticuerpos específicos para uPA, uPAR y complejos binarios y ternarios de los mismos
- [0059] En la siguiente descripción, se hará referencia a varias metodologías conocidas por los expertos en la técnica de inmunología, biología celular, y biología molecular. Las obras de referencia estándar que establecen los principios generales de inmunología incluyen Abbas, AK et al., Cellular and Molecular Immunology (Fourth Ed.), W.B. Saunders Co., Philadelphia, 2000; Janeway, CA et al., Immunobiology. The Immune System in Health and Disease, 4th ed., Garland Publishing Co., New York, 1999; Roitt, I et al., Immunology, (current ed.) C.V. Mosby Co., St. Louis, MO (1999); Klein, J, Immunology, Blackwell Scientific Publications, Inc., Cambridge, MA, (1990).
- 20 [0060] Los anticuerpos monoclonales (mAbs) y los métodos para su producción y uso se describen en Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975); U.S. Patent No. 4,376,110; Hartlow, E. et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988); Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York, NY (1980); H. Zola et al., in Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, 1982).
- 25 [0061] Los métodos de inmunoensayo también se describen en Coligan, JE et al., eds., Current Protocols in Immunology, Wiley-Interscience, New York 1991 (or current edition); Butt, WR (ed.) Practical Immunoassay: The State of the Art, Dekker, New York, 1984; Bizollon, CA, ed., Monoclonal Antibodies and New Trends in Immunoassays, Elsevier, New York, 1984; Butler, JE, ELISA (Chapter 29), In: van Oss, CJ et al., (eds), IMMUNOCHEMISTRY, Marcel Dekker, Inc., New York, 1994, pp. 759-803; Butler, JE (ed.), Immunochemistry of Solid Phase Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, 1991; Weintraub, B, Principles of Radioimmunoassays, The Endocrine Society, March, 1986; Work, TS et al., Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, NY, 1978; Dabbs, DJ, Diagnostic Immunohistochemistry, Churchill Livingstone, 2001.
- 30 [0062] Los anticuerpos anti-idiotípicos se describen, por ejemplo, en Idiotypy in Biology and Medicine, Academic Press, New York, 1984; Immunological Reviews Vol. 79, 1984 and Vol. 90, 1986; Curr. Top. Microbiol., Immunol. Vol. 119, 1985; Bona, C. et al., CRC Crit. Rev. Immunol., pp. 33-81 (1981); Jerne, NK, Ann. Immunol. 125C:373-389 (1974); Urbain, J et al., Ann. Immunol. 133D:179- (1982); Rajewsky, K. et al., Ann. Rev. Immunol. 1:569-607 (1983).
- 35 [0063] La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales reactivos con complejos uPA/uPAR que inhiben las interacciones de uPAR con integrinas u otros objetivos aguas abajo. Los anticuerpos pueden ser xenogénicos, allogenéticos, singénicos o formas modificadas de los mismos, tales como anticuerpos quiméricos o humanizados. También se describen anticuerpos antidiotípicos específicos para el idiotipo de, por ejemplo, un Ab anti-uPA-uPAR. El término "anticuerpo" también pretende abarcar tanto moléculas intactas como fragmentos de las mismas que incluyen el sitio de unión al antígeno y que son capaces de unirse a un epítipo objetivo, por ejemplo, uPA/uPAR o complejo de uPAR-integrina. Estos incluyen, fragmentos de Fab y F(ab')<sub>2</sub> a los que les falta el fragmento Fc de un Ab intacto, que se eliminan más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos unión de tejido no-específico que un Ab intacto
- 40
- 45
- 50

(Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)). También se incluyen fragmentos de Fv (Hochman, J. et al. (1973) Biochemistry 12:1130-1135; Sharon, J. et al. (1976) Biochemistry 15:1591-1594). Estos diferentes fragmentos se producen utilizando técnicas convencionales tales como escisión de proteasa o escisión química (véase, por ejemplo, Rousseaux et al., Meth. Enzymol., 121:663-69 (1986)).

[0064] Los anticuerpos policlonales se obtienen como sueros de animales inmunizados tales como conejos, cabras, roedores, etc. y se pueden utilizar directamente sin más tratamiento o se puede someter a enriquecimiento convencional o métodos de purificación tales como precipitación de sulfato amónico, cromatografía de intercambio de iones, y cromatografía de afinidad (ver Zola et al., *supra*).

[0065] Un inmunógeno para la generación de los anticuerpos de esta invención puede comprender uPAR, suPAR, complejos uPA/uPAR o uPAR-integrina o fragmentos portando epítopos o derivados de los mismos. Se producen inmunógenos útiles de diferentes formas conocidas en la técnica, por ejemplo, expresión de genes clonados utilizando métodos recombinantes convencionales, aislamiento a partir de células de origen, poblaciones celulares expresando altos niveles de, por ejemplo, uPA o uPAR, etc. En el caso de fragmentos más cortos, se pueden sintetizar químicamente. Un inmunógeno preferido es el fragmento D2D3 de suPAR.

[0066] Los mAbs se pueden producir usando tecnología de hibridoma convencional, tal como los procedimientos introducidos por Kohler y Milstein (Nature, 256:495-97 (1975)), y modificaciones de los mismos (ver referencias arriba). Un animal, preferiblemente un ratón, se ceba por inmunización con un inmunógeno como el anterior para suscitar la respuesta de Ab deseada en el animal cebado.

[0067] Los linfocitos B de los ganglios linfáticos, bazo o sangre periférica de un animal cebado se funden con las células de mieloma, generalmente en presencia de un agente de promoción de fusión tal como polietilenglicol (PEG). Cualquiera de una variedad de líneas celulares de mieloma murino está disponible para tal uso: las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1; P3-x63-k0Ag8.653; Sp2/0-Ag14 o HL1-653 (disponibles del ATCC, Rockville, MD). Los siguientes pasos incluyen cultivo en medio selectivo de modo que las células de mieloma parental no-fusionadas y las células de linfocito de donante eventualmente mueren mientras que sólo las células de hibridoma sobreviven. Éstas se clonan y cultivan y sus sobrenadantes se criban para presencia de Ab de la especificidad deseada, por ejemplo, por técnicas de inmunoensayo. Los clones positivos se subclonan, por ejemplo, por dilución limitante, y los mAbs se aíslan.

[0068] Los hibridomas producidos según estos métodos se pueden propagar *in vitro* o *in vivo* (en líquido ascítico) mediante técnicas conocidas en la técnica (ver principalmente Fink et al., Prog. Clin. Pathol., 9:121-33 (1984)). Generalmente, la línea celular individual se propaga en cultivo y los medios de cultivo conteniendo altas concentraciones de un único mAb se pueden cosechar por decantación, filtración, o centrifugado.

#### Producción de mAbs

[0069] Un método preferido para producir un mAb según la presente invención es como sigue. Se prepara D2D3 a partir de suPAR utilizando digestión quimotriptica y purificación (Shliom, O. et al., (2000) J. Biol. Chem. 275:24304-12). Después, D2D3 se conjuga para cualquier proteína portadora útil tal como albúmina, hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) u ovalbúmina. Las inmunizaciones se llevan a cabo típicamente en el adyuvante de Freund completo seguido de explosiones periódica en el adyuvante de Freund incompleto. También se saca sangre a los animales periódicamente y el título del suero se mide usando un ELISA en el que suPAR se inmoviliza en la superficie de pocillos de microplaca.

[0070] Si se usa un péptido, preferiblemente se conjuga con una proteína portadora, por ejemplo, KLH, y se inyecta en ratones BALB/c intraperitonealmente (i.p.) en adyuvante completo de Freund (p. ej., 50 µg conjugado), seguido de dos inyecciones adicionales de la misma dosis en el adyuvante de Freund incompleto a intervalos de dos semanas. Después de un mes, se añade una inyección final i.p. (p. ej., 50 µg en 0,5 ml PBS) y preferiblemente también por vía intravenosa (i.v.) (p. ej., 50 µg en 0,2ml) sin adyuvante.

[0071] Las células de bazo se cosechan tres días después de la inyección final y se funden con P3X63AF8/653 u otras células de mieloma utilizando técnicas estándar.

#### Células de prueba para selección y caracterización de anticuerpos

[0072] El suPAR puro inmovilizado sobre plástico se prefiere para la selección primaria. Las células tales como la línea HeLa que sobreexpresan uPAR puede usarse también para demostrar la unión celular de un mAb anti-suPAR. Muchas líneas celulares tumorales expresando uPAR son bien conocidas y están disponibles públicamente; éstas se pueden utilizar para selección. Las células se colocan generalmente en microplacas de 96-pocillos. Las células se pueden fijar, por ejemplo, con metanol/acetona (50/50), y la unión se puede detectar por coloración de inmunofluorescencia. Alternativamente, los mAbs se pueden radiomarcarse y la unión se puede detectar por medición de radioactividad.

[0073] En una forma de realización, un sobrenadante de hibridoma (p. ej., 50 µl) se añade a los pocillos que contienen células 293 fijadas durante aproximadamente 1,5 h a 37°C. Las placas se lavan dos veces en tampón de lavado (tal

como PBS/0,05% Tween-20), y se adiciona IgG de cabra anti-ratón conjugado con rojo rodamina (p. ej., 30 µl/pocillo) en una dilución apropiada, tal como 1:100, durante 1,5 h a 37°C. Después del lavado en un tampón de lavado, las células se examinan en busca de la presencia de Inmunofluorescencia; en la forma de realización descrita aquí, se usó microscopía de fluorescencia.

[0074] En esta forma de realización, la inmunofluorescencia es la base para determinar si un sobrenadante de hibridoma contiene un Ab específico para el complejo uPA/uPAR (aunque también puede usarse la coloración inmunohistoquímica). Si los sobrenadantes muestran coloración positiva, los clones de hibridoma se seleccionan, se expanden y los sobrenadantes se evalúan para reactividad al complejo mediante ELISA.

[0075] En un ELISA preferido, el péptido se acopla a ovalbúmina (OVA) como una proteína portadora y el conjugado péptido/OVA se recubre en los pocillos de la placa de enzimoanálisis de 96 pocillos que recibe, por ejemplo, 2µg/ml de conjugado en 50µl de tampón de recubrimiento (0,2 M Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> /NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6). Las placas se incuban durante toda la noche a 4°C, bloqueadas con un tampón de bloqueo apropiado, por ejemplo, PBS conteniendo 1% BSA (200 µl/pocillo) durante toda la noche a 4°C. Se añaden sobrenadantes de hibridoma (por ejemplo; 50µl) a los pocillos durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavan dos veces en el tampón de lavado (p. ej., PBS / 0,05% Tween-20), y el Ab secundario acoplado a la enzima, tal como IgG de cabra-anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina se añade (50 µl/pocillo) en una dilución apropiada, por ejemplo, 1:2000. Las placas se incuban durante 1,5 horas a TA. Después de lavar el 4X en el tampón de lavado, un sustrato cromogénico apropiado para la enzima, por ejemplo, CP-nitrofenilfosfato en esta forma de realización (disponible de Kirkegaard and Perry Co., Gaithersburg, MD), se añade durante aproximadamente 30 min y se mide la absorbancia a longitud de onda apropiada para el producto coloreado (aquí 405nm). Los sobrenadantes de hibridoma que reaccionan fuerte con el péptido portando el epítipo (p. ej., A<sub>405</sub> >1,0 cuando los controles negativos son <0,02) se reclonan (preferiblemente dos veces), y la reactividad de mAb se confirma nuevamente por ELISA como se ha hecho anteriormente.

[0076] El término "anticuerpo" abarca tanto las moléculas de inmunoglobulina (Ig) intacta como los fragmentos y derivados de las mismas, que se pueden producir por escisión proteolítica de moléculas de Ig o crearse genética o químicamente. Los fragmentos incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, cada uno de los cuales es capaz de unirse al antígeno. Estos fragmentos no tienen el fragmento de Fc de Ab intacto y tienen una ventaja adicional, si se usan terapéuticamente, se despejan más rápidamente de la circulación y experimentan menos unión a tejido no-específico que los anticuerpos intactos. El tratamiento con papaína de Igs produce fragmentos de Fab; tratamiento con pepsina produce fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos también se pueden producir por ingeniería genética o proteica utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Un fragmento de Fab es una proteína multimérica que consiste en la parte de una molécula de Ig conteniendo las partes activas inmunológicamente de una cadena pesada de Ig (H) y una cadena ligera de Ig (L) de manera covalentemente acopladas entre sí y capaces de combinarse específicamente con antígeno. Los fragmentos de Fab se preparan típicamente mediante digestión proteolítica de moléculas de Ig intactas sustancialmente con papaína utilizando métodos que se conocen en la técnica. No obstante, un fragmento de Fab se puede preparar también mediante expresión en una célula huésped adecuada de las partes deseadas de la cadena H y la cadena L de Ig utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Un fragmento de (Fab')<sub>2</sub> es un tetrámero que incluye un fragmento de dos cadenas H y dos cadenas L. El fragmento de Fv es una proteína multimérica que consiste en las partes inmunológicamente activas de una región variable (V) de la cadena H de Ig (V<sub>H</sub>) y una región V de la cadena L de Ig (V<sub>L</sub>) acopladas de manera covalente y capaces de combinarse específicamente con antígeno. Los fragmentos de Fv se preparan típicamente por expresión en la célula huésped adecuada de las partes deseadas de la región V<sub>H</sub> y la región V<sub>L</sub> de Ig utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

[0077] La proteína de unión al antígeno monocatenaria o Ab monocatenario, también llamado "scFv" es un polipéptido compuesto por una secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> de Ig atado a una secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> de Ig mediante un péptido que une el C-termino de la secuencia de V<sub>L</sub> al N-termino de la secuencia de V<sub>H</sub>.

[0078] En una forma de realización preferida, el Ab es un mAb designado ATN-658, que es un anticuerpo de IgG1.

[0079] En otra forma de realización descrita, el Ab es un Ab quimérico que reconoce un epítipo reconocido por ATN-658.

#### Anticuerpos quiméricos

[0080] Los anticuerpos quiméricos de la invención comprenden cadenas de Ig L y H individuales quiméricas. La cadena H quimérica comprende una región de unión al antígeno derivada de la cadena H de un Ab no humano específico para, por ejemplo, complejo de uPA/uPAR o uPAR-integrina, por ejemplo, mAb ATN-658, que se enlaza a por lo menos una parte de una región C<sub>H</sub> humana. Una cadena L quimérica comprende una región de unión al antígeno derivada de la cadena L de un Ab no humano específico para el antígeno objetivo, tal como el hibridoma ATN-658, enlazado con al menos una parte de una región C<sub>L</sub> humana. Como se utiliza en este caso, el término "región de unión al antígeno" se refiere a esa parte de una molécula de Ab que contiene los residuos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren al Ab su especificidad y afinidad con el antígeno. La región Ab incluye los residuos de aminoácidos "marco" necesarios para mantener la conformación apropiada de los residuos de unión al antígeno (o "de contacto").

[0081] Como se utiliza en este caso, el término "anticuerpo quimérico" incluye, Igs monovalentes, bivalente y polivalentes. Un Ab quimérico monovalente es un dímero de HL formado por una cadena H quimérica asociado a través de puentes de disulfuro con una cadena L quimérica. Un Ab quimérico bivalente es un tetrámero H<sub>2</sub> L<sub>2</sub> formado por dos dimeros HL asociados a través de al menos un puente de disulfuro. Un Ab quimérico polivalente puede también producirse, por ejemplo, utilizando una región de C<sub>H</sub> que agrega (p. ej., de una cadena H de IgM, denominado la μ.cadena).

[0082] La invención también proporciona "derivados" de los mAbs de ratón o de los Abs quiméricos, término que incluye aquellas proteínas codificadas por genes modificados o truncados para producir especies moleculares que funcionalmente se asemejan a los fragmentos de Ig. Las modificaciones incluyen, pero de forma no limitativa, adición de secuencias genéticas que codifican para proteínas citotóxicas tales como toxinas vegetales y bacterianas. Los fragmentos y derivados se pueden producir a partir de cualquiera de los huéspedes de esta invención.

[0083] Los anticuerpos, fragmentos o derivados con cadenas H y cadenas L quiméricas de la misma o diferente especificidad de enlace de región V, se pueden preparar por asociación apropiada de las cadenas de polipéptido individuales, como mostró, por ejemplo Sears et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:353-357 (1975). Con este método, huéspedes expresando cadenas H quiméricas (o sus derivados) se cultivan separadamente de huéspedes expresando cadenas L quiméricas (o sus derivados), y las cadenas de Ig cadenas se recuperan separadamente y después se asocian. Alternativamente, las huéspedes se puede cocultivar y se puede permitir a las cadenas asociarse espontáneamente en el medio de cultivo, y la recuperación posterior del Ig ensamblado, fragmento o derivado.

[0084] La región de unión al antígeno del Ab quimérico (o un mAb humano) de la presente invención se deriva preferiblemente de un Ab no humano específico para, por ejemplo, el complejo uPA/uPAR o uPAR-integrina. Las fuentes preferidas para que el ADN codifique tal Ab no humano incluyen líneas celulares que producen Ab, preferiblemente hibridomas.

[0085] Un hibridoma preferido es ATN-658 que se produjo como se ha descrito anteriormente y cuyas regiones V tienen las secuencias mostradas más arriba.

[0086] Así, un Ab quimérico preferido (o Ab humano) tiene una secuencia V<sub>L</sub> con SEQ ID n°: 1 y una secuencia V<sub>H</sub> con SEQ ID n°: 2 que son las secuencias de consenso de mAb ATN-658. Los residuos de estas regiones V que no están en las regiones CDR pueden ser variados, preferiblemente como sustituciones conservadoras, puesto que la región V produce un Ab con la misma especificidad de antígeno y sustancialmente la misma afinidad o avidez de unión al antígeno, preferiblemente al menos 20% de la afinidad o la avidez de un Ab donde la secuencia V<sub>L</sub> es SEQ ID n°: 1 y la secuencia V<sub>H</sub> es SEQ ID n°: 2. Se prefiere que en este Ab quimérico (o humano), las tres regiones CDR de la cadena de V<sub>L</sub> sean SEQ ID n°: 3, 4 y 5 y las tres regiones CDR de la cadena V<sub>H</sub> sean SEQ ID n°: 6, 7 y 8.

[0087] Las moléculas de ácido nucleico preferidas para su uso en la construcción de un Ab quimérico (o Ab humano) de esta invención son (a) una molécula de ácido nucleico con una secuencia de codificación que codifica una región V<sub>L</sub> con la secuencia SEQ ID n°: 1 y (b) una molécula de ácido nucleico con una secuencia de codificación que codifica una cadena V<sub>H</sub> con la secuencia SEQ ID n°: 2. También se prefiere una molécula de ácido nucleico que codifica una región V<sub>L</sub> que comprende las tres CDRs SEQ ID n°: 3, 4 y 5 y una molécula de ácido nucleico que codifica un región V<sub>H</sub> que comprende las tres CDRs SEQ ID n°: 6, 7 y 8.

[0088] Alternativamente, la célula de producción de Ab no humano a partir de la cual se deriva la región V del Ab de la invención puede ser un linfocito B obtenido de la sangre, el bazo, los ganglios linfáticos u otro tejido de un animal inmunizado con D2D3 de suPAR. La célula de producción de Ab que aporta las secuencias de nucleótidos que codifican la región de unión al antígeno del Ab quimérico de la presente invención puede también producirse por transformación de una célula no-humana, tal como la de un primate, o humana. Por ejemplo, un linfocito B que produce un Ab específico, por ejemplo, un complejo uPA/uPAR o uPAR-integrina se puede infectar y transformar con un virus, tal como el virus de Epstein-Barr para producir una célula de producción de Ab inmortal (Kozbor et al. Immunol. Today 4:72-79 (1983)). Alternativamente, el linfocito B se puede transformar mediante un gen de transformación o producto genético de transformación, como bien se conoce en la técnica. Preferiblemente, la región de unión al antígeno será de origen murino. En otras formas de realización, la región de unión al antígeno puede derivarse de otras especies animales, en particular roedores, tales como rata o hámster.

[0089] El Ab quimérico o murino de la presente invención se puede producir en grandes cantidades inyectando hibridoma o células de transfectoma que secretan el Ab en la cavidad peritoneal de ratones y, después de un tiempo apropiado, cosechando el líquido ascítico que contiene un alto título del mAb, y aislando el mAb de ello. Para este tipo de producción *in vivo* del mAb con un hibridoma no murina (p. ej., de rata o humano), las células de hibridoma se cultivan preferiblemente en ratones desnudos atímicos o irradiados.

[0090] Alternativamente, los anticuerpos se pueden producir cultivando células de hibridoma (o de transfectoma) *in vitro* y aislando el mAb segregado del medio de cultivo celular.

65

[0091] Los genes humanos que codifican las regiones C constantes de los anticuerpos quiméricos de la presente invención pueden ser derivadas de una genoteca de hígado humano fetal o de cualquier célula humana, incluidas aquéllas que expresan y producen Igs humana. La región C<sub>H</sub> humana puede derivarse de cualquiera de las clases o isotipos de cadenas H humanas conocidos, incluyendo  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  o  $\epsilon$ , y subtipos de los mismos, tales como G1, G2, G3 y G4. Ya que el isotipo de la cadena H es responsable de las diferentes funciones efectoras de un Ab, la elección de la región C<sub>H</sub> estará guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como fijación o actividad del complemento en la citotoxicidad celular dependiente del Ab (ADCC). Preferiblemente, la región C<sub>H</sub> se deriva de  $\gamma$ 1 (IgG1),  $\gamma$ 3 (IgG3),  $\gamma$ 4 (IgG4) o  $\mu$  (IgM).

[0092] La región C<sub>L</sub> humana puede derivarse bien del isotipo de la cadena L humana  $\kappa$  o  $\lambda$ .

[0093] Los genes que codifican regiones C de Ig humanas se obtienen de células humanas por técnicas de clonación estándar (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Los genes de la región C humana están fácilmente disponibles a partir de clones conteniendo genes que representan las dos clases de cadenas L, las cinco clases de cadenas H y las subclases de las mismas. Los fragmentos de ab quimérico, tales como F(ab')<sub>2</sub> y Fab, se puede preparar diseñando un gen de cadena H quimérica que se trunca apropiadamente. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una parte de la cadena H de un fragmento de F(ab')<sub>2</sub> incluiría secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguido de un codón de terminación traduccional para producir la molécula truncada.

[0094] Generalmente, los anticuerpos quiméricos de la presente invención se producen clonando los segmentos de ADN que codifican las regiones de unión al antígeno de la cadena L y H de un Ab específico de la invención, preferiblemente no-humano, y juntado estos segmentos de ADN con segmentos de ADN que codifican regiones C<sub>L</sub> y C<sub>H</sub> humanas, respectivamente, para producir genes de codificación de Ig quiméricos.

[0095] Así, en una forma de realización preferida, se crea un gen fusionado que comprende un primer segmento de ADN que codifica al menos la región de unión al antígeno de origen no-humano, tal como una región V funcionalmente reordenada con segmento de juntado (J), enlazado a un segundo segmento de ADN que codifica al menos una parte de una región C humana.

[0096] El ADN que codifica la región de unión al Ab puede ser ADN genómico o ADNc. Una alternativa conveniente para el uso de fragmentos de gen cromosómico como la fuente de ADN que codifica el segmento de unión al antígeno de la región V murina es el uso de ADNc para la construcción de genes de Ig quimérica, como proporciona Liu et al. (Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84:3439 (1987); J. Immuno. 139:3521 (1987)). El uso de ADNc requiere que los elementos de expresión génica sean apropiados para que la célula huésped se combine con el gen para conseguir síntesis de la proteína deseada. El uso de secuencias de ADNc es ventajoso en secuencias genómicas (que contienen intrones), debido a que las secuencias de ADNc se pueden expresar en bacterias u otros huéspedes que no cuentan con sistemas de empalme de ARN apropiados.

[0097] Por lo tanto, en una forma de realización, utilizando ADNc que codifica la región V de Ab, el método para producir el Ab quimérico implica diferentes pasos, perfilados a continuación:

1. Aislamiento del ARN mensajero (mRNA) de la línea celular que produce el mAb, clonación y producción de ADNc de los mismos;
2. Preparación de una genoteca de ADNc de longitud total a partir de ARNm purificado donde los segmentos génicos de la región V apropiada de los genes de cadena L y H pueden ser: (i) identificados con sondas apropiadas, (ii) ordenados y (iii) compatibilizados con un segmento de gen C;
3. Preparación de segmentos génicos de la región C por preparación y clonación de ADNc;
4. Construcción de secuencias de codificación de la cadena L o H completas por conexión de los segmentos génicos de la región V específica clonada con el gen de la región C humana clonado, como se ha descrito anteriormente;
5. Expresión y producción de cadenas L y H quiméricas en huéspedes seleccionados, células de eucarióticas y procarióticas incluidas.

[0098] Una característica común de todos los genes de cadena H y L de Ig y sus ARNm codificados es la región J. Las regiones J de la cadena H y L tienen secuencias diferentes, pero existe un alto grado de homología secuencial (mayor al 80%) entre cada grupo, especialmente cerca de la región C. Esta homología se aprovecha en este método y las secuencias de consenso de las regiones J de la cadena H y L se pueden utilizar para diseñar oligonucleótidos para su uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para conexión posterior de los segmentos de región V con segmentos de la región C humana.

[0099] Los vectores de ADNc de la región C obtenidos a partir de células humanas se pueden modificar por mutagénesis dirigida de sitio para colocar un sitio de restricción en la posición análoga de la secuencia humana. Por ejemplo, se puede clonar la región C de la cadena  $\kappa$  humana completa (C <sub>$\kappa$</sub> ) y la región C humana  $\gamma$ -1 completa (C <sub>$\gamma$ -1</sub>). En este caso, el método alternativo basado en clones de la región C genómicos como fuente para los vectores de la región C no permiten que estos genes se expresen en sistemas bacterianos donde las enzimas necesarias para eliminar

secuencias de intervención están ausentes. Los segmentos de la región V clonados se cortan y ligan a vectores de la región C de la cadena L o H. Alternativamente, la región de  $C_{V-1}$  humana se puede modificar por introducción de un codón de terminación, generando así una secuencia génica que codifica la parte de la cadena H de una molécula de Fab. Las secuencias de codificación con regiones V y C enlazadas se transfieren después a vehículos de expresión apropiados para la expresión en huéspedes apropiados, eucarióticos o procarióticos.

[0100] Se dice que dos secuencias de ADN de codificación están "operativamente enlazadas" si el enlace produce una secuencia continuamente traducible sin alteración o interrupción del marco de lectura de triplete. Una secuencia codificante de ADN se enlaza operativamente a un elemento de expresión genética si el enlace produce la función apropiada de este elemento de expresión genética para dar como resultado la expresión de la secuencia codificante.

[0101] Los vehículos de expresión incluyen plásmidos u otros vectores. Los preferidos entre estos son los vehículos que portan una secuencia de cadena  $C_L$  o  $C_H$  humana completa funcionalmente con sitios de restricción apropiados creado genéticamente de modo que cualquier secuencia de cadena  $V_H$  o  $V_L$  con extremos cohesivos apropiados pueda insertarse fácilmente en estos. Los vehículos que contienen secuencia de cadena  $C_H$  o  $C_L$  humana sirven de este modo como intermediarios para la expresión de cualquier cadena H o L completa deseada en cualquier huésped apropiado.

[0102] Un Ab ratón-humano quimérico se sintetizará típicamente a partir de genes conducidos por los promotores de gen cromosómico nativos de las regiones V de la cadena L y H de ratón usados en los constructos. El empalme ocurre normalmente entre el sitio donante de empalme de la región J de ratón y el sitio aceptor de empalme precediendo la región C humana y también en las regiones de empalme que existen dentro de la región  $C_H$  humana; la poliadenilación y la terminación de transcripción ocurren en sitios cromosómicos nativos aguas abajo de las regiones de codificación humana.

[0103] Los elementos de expresión génica útiles para la expresión de genes de ADNc incluyen: (a) promotores de transcripción vírica y sus elementos intensificadores, tales como el promotor temprano SV40 (Okayama, H. et al., Mol. Cell. Biol. 3:280 (1983)), LTR del virus de sarcoma de Rous (Gorman, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 79:6777 (1982)), y LTR del virus de leucemia murina de Moloney (Grosschedl, R et al., Cell 41:885 (1985)); (b) regiones de empalme y sitios de poliadenilación tales como los derivados de la región tardía SV40 (Okayama et al., *supra*); y (c) sitios de poliadenilación tales como en SV40 (Okayama et al., *supra*).

[0104] Los genes de ADNc de Ig se pueden expresar como describe Liu et al., *supra*, y Weidle, UH et al., Gene 51:21-29 (1987), usando como elementos de expresión el promotor temprano SV40 y su intensificador, los potenciadores promotores de la cadena H de Ig de ratón, el empalme de ARNm de la región tardía de SV40, secuencia de intervención de  $\beta$ -globina de conejo, sitios de poliadenilación de Ig y de  $\beta$ -globina de conejo y elementos de poliadenilación SV40. Para los genes de Ig compuestos en parte de ADNc, parte de ADN genómico (Whittle, N et al., Protein Eng. 1:499-505 (1987), el promotor transcripcional es citomegalovirus humano, los potenciadores promotores son citomegalovirus e Ig de ratón/humana y el empalme y las regiones de poliadenilación de ARNm son de las secuencias de Ig cromosómicas nativas. En una forma de realización, para la expresión de genes de ADNc en las células de roedor, el promotor transcripcional es una secuencia de LTR viral, los potenciadores promotores transcripcionales son el intensificador de la cadena H de Ig de ratón y/o el intensificador de LTR vírico, la región de empalme contiene un intrón superior a 31 pares de bases, y las regiones de terminación de poliadenilación y de transcripción se derivan de la secuencia cromosómica nativa correspondiente a la cadena de Ig que se sintetiza. En otras formas de realización, las secuencias de ADNc que codifican otras proteínas se combinan con los elementos de expresión anteriormente nombrados para conseguir la expresión de las proteínas en células mamíferas.

[0105] Cada gen fusionado se ensambla o inserta en un vector de expresión. Las células receptoras capaces de expresar el producto génico de la cadena de Ig quimérica se modifican más adelante individualmente con un gen de codificación de cadena L quimérica o H quimérica, o se comodifica con un gen de cadena L quimérica y H quimérica. Las células receptoras modificadas se cultivan bajo condiciones que permiten la expresión de los genes incorporados y las cadenas de Ig expresadas o anticuerpos o fragmentos intactos se recuperan del cultivo. En una forma de realización, los genes fusionados que codifican las cadenas L y H quiméricas, o partes de las mismas, se ensamblan en vectores de expresión separados que se usan luego para cotransfectar una célula receptora.

[0106] Cada vector puede contener dos genes seleccionables, un primer gen seleccionable diseñado para la selección en un sistema bacteriano y un segundo gen seleccionable diseñado para la selección en un sistema eucariota, donde cada vector tiene un par diferente de genes. Esta estrategia produce vectores que primero dirigen la producción, y permiten la amplificación, de los genes fusionados en un sistema bacteriano. Los genes producidos de este modo y amplificados en un huésped bacteriano se usan posteriormente para co-transfectar una célula eucariota, y permitir la selección de una célula co-transfectada que porta los genes transfectados deseados. Ejemplos de genes seleccionables para su uso en un sistema bacteriano son el gen que confiere resistencia a la ampicilina y el gen que confiere resistencia al cloranfenicol. Los genes preferidos seleccionables para su uso en transfectantes eucarióticos incluyen el gen de xantina-guanina-fosforribosil-transferasa (denominado gtp) y el gen de fosfotransferasa de Tn5 (denominado neo).

[0107] La selección de células que expresan gtp se basa en el hecho de que la enzima codificada por este gen utiliza xantina como sustrato para la síntesis de nucleótido de purina, mientras que la enzima análoga endógena no puede. En un medio que contiene (1) ácido micofenólico, que bloquea la conversión de monofosfato de inosina en monofosfato de xantina (XMP), y (2) xantina, sólo pueden sobrevivir las células que expresan el gen de gpt. El producto del gen de neo bloquea la inhibición de síntesis de proteína por el antibiótico G418 y otros antibióticos del tipo de la neomicina.

[0108] Los dos procedimientos de selección se pueden usar simultáneamente o consecutivamente para seleccionar la expresión de genes de cadena de Ig introducidos en dos vectores de ADN diferentes en una célula eucariota. No es necesario incluir marcadores seleccionables diferentes para células eucarióticas; un vector de la cadena L y uno de la H, cada uno con el mismo marcador seleccionable pueden ser co-transfectados. Después de seleccionar las células resistentes apropiadamente, la mayoría de los clones contendrán copias integradas de ambos vectores de la cadena L.

[0109] Alternativamente, los genes fusionados que codifican las cadenas L y H quiméricas pueden estar ensamblados en el mismo vector de expresión.

[0110] Para la transfección de los vectores de expresión y la producción del Ab quimérico, la línea celular receptora preferida es una célula de mieloma. Células de mieloma pueden sintetizar, ensamblar y segregan Igs codificados por genes de Ig modificados y poseer el mecanismo para la glicosilación del Ig. Una célula receptora particularmente preferida es la célula de mieloma que no produce Ig SP2/0 (ATCC #CRL 8287). Las células SP2/0 producen sólo Ig codificadas por los genes modificados. Las células de mieloma se pueden cultivar en cultivo o en la cavidad peritoneal de un ratón, donde la Ig segregada puede obtenerse del líquido ascítico. Otras células receptoras adecuadas incluyen células linfoides tales como linfocitos B de origen humano o no-humano, células de hibridoma de origen humano o no-humano, o células de heterohibridoma de interespecies.

[0111] El vector de expresión que porta un constructo de ab quimérico de la presente divulgación se puede introducir en una célula huésped apropiada por cualquiera de una variedad de medios adecuados, incluyendo tales medios bioquímicos como transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplasto, precipitación de fosfato de calcio, y aplicación con policationes tal como dietilaminoetil (DEAE) dextrano, y tales medios mecánicos como electroporación, microinyección directa, y bombardeo con microproyectiles.

[0112] Las secuencias o genes de codificación de Ig quimérico de la presente divulgación se pueden expresar también en células mamíferas no linfoides o en otras células eucarióticas, tal como levadura, o en células procarióticas, en particular bacterias. La levadura proporciona ventajas sustanciales sobre las bacterias para la producción de cadenas H y L de Ig. Las levaduras llevan a cabo modificaciones peptídicas postraduccionales incluyendo glicosilación. Actualmente existen varias estrategias de DNA recombinante que utilizan secuencias promotoras fuertes y plásmidos de alto número de copia que se pueden usar para la producción de las proteínas deseadas en la levadura. La levadura reconoce secuencias líder de productos génicos mamíferos clonados y secreta péptidos que portan secuencias líder (es decir, prepéptidos). Los sistemas de expresión génica de la levadura se pueden evaluar rutinariamente para los niveles de producción, secreción y la estabilidad de las proteínas de la cadena H y L quimérica y de los Abs ensamblados quiméricos. Se puede utilizar cualquier sistema de una serie de sistemas de expresión génica de levadura que incorporan elementos promotores y de terminación de los genes expresados activamente que codifican para enzimas glicolíticas producidas en grandes cantidades cuando las levaduras crecen en medios ricos en glucosa. Los genes glicolíticos conocidos puede también proporcionar señales de control de transcripción muy eficaces. Por ejemplo, se pueden utilizar las señales promotora y terminadora del gen de fosfoglicerato quinasa (PGK). Se pueden tomar varios métodos para valorar plásmidos de expresión óptimos para la expresión de ADNcs de Ig clonados en levadura (ver Glover, D.M., ed., DNA Cloning, IRL Press, 1985).

[0113] Se pueden utilizar cepas bacterianas como huéspedes para la producción de moléculas Ab o fragmentos Ab descrito por esta invención, cepas K12 de *E. coli* tales como W3110 de *E. coli* (ATCC# 27325), y otras enterobacterias tales como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcescens*, y se pueden utilizar diferentes especies de *Pseudomonas*.

[0114] Los vectores plásmidos que contienen replicón y secuencias de control que se derivan de especies compatibles con una célula huésped se usan en relación con estos huéspedes bacterianos. El vector lleva un sitio de replicación, al igual que genes específicos que son capaces de selección fenotípica de provisión en células transformadas. Se pueden tomar varios para evaluar los plásmidos de expresión para la producción de Abs quiméricos o cadenas Ab codificados por los ADNcs de Ig clonados en bacterias (ver Glover, *supra*).

[0115] Los huéspedes preferidos son células mamíferas, cultivadas *in vitro* o *in vivo*. Las células mamíferas proporcionan modificaciones postraduccionales para moléculas de proteína de Ig incluyendo eliminación del péptido líder, pliegue y ensamblaje de cadenas H y L, glicosilación de las moléculas Ab y secreción de proteína Ab funcional. Las células mamíferas que pueden ser útiles como huéspedes para la producción de proteínas Ab, además de las células de origen linfóide descritas anteriormente, incluyen células de origen de fibroblasto, tales como Vero (ATCC CRL 81) o CHO-K1 (ATCC CRL 61). Hay muchos sistemas de vector disponibles para la expresión de genes de la cadena H y L clonados en células mamíferas (ver Glover, *supra*). Se pueden seguir diferentes métodos para obtener Abs H<sub>2</sub> L<sub>2</sub> completos.

5 [0116] Para el uso *in vivo*, particularmente para la inyección en seres humanos, es deseable reducir la inmunogenicidad del mAb mediante la fabricación de Abs quiméricos ratón-humano (o roedor-humano) como más arriba, o por humanización del Abs utilizando métodos conocidos en la técnica. El Ab humanizado puede ser el producto de un animal con genes de región Constante de Ig humana (ver por ejemplo WO90/10077 y WO90/04036). Alternativamente, el Ab de interés puede crearse genéticamente para sustituir los dominios CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> de bisagra, y/o el dominio de estructura con la secuencia humana correspondiente (ver WO92/02190).

#### Anticuerpos monocatenarios

10 [0117] El Ab de la presente invención puede producirse como un Ab o scFv monocatenario en vez de la estructura normal multimérica. Los Abs monocatenarios incluyen las regiones hipervariables de una Ig nativa de interés y recrean el sitio de unión al antígeno de la Ig nativa mientras sigue siendo una fracción del tamaño de la Ig intacta (Skerra, A. et al. (1988) Science, 240: 1038- 1041; Pluckthun, A. et al. (1989) Methods Enzymol. 178: 497-515; Winter, G. et al. (1991) Nature, 349: 293-299); Bird et al., (1988) Science 242:423; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Jost CR et al., J Biol Chem. 1994 269:26267-26273; U.S. Patents No. 4,704,692, 4,853,871, 4,94,6778, 5,260,203, 5,455,030). Las secuencias de ADN que codifican las regiones V de la cadena H y la cadena L se ligan a un enlazador que codifica al menos aproximadamente 4 aminoácidos (típicamente aminoácidos pequeños neutrales). La proteína codificada por esta fusión permite el ensamblaje de una región variable funcional que retiene la especificidad y la afinidad del Ab original.

20 [0118] Un método para producir los Abs de la presente invención es conectar dos o más péptidos o polipéptidos juntos mediante técnicas de química de proteína. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos se pueden sintetizar químicamente utilizando equipamiento de laboratorio habitualmente disponible usando bien química Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) o tBoc (tert butiloxicarbonilo). (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Un experto en la técnica puede apreciar rápidamente que un péptido o polipéptido correspondiente a una cadena Ab o fragmento de unión al antígeno de la misma se puede sintetizar por reacciones químicas estándar. Por ejemplo, un péptido o polipéptido se puede sintetizar pero no escindir de su resina de síntesis mientras que el otro fragmento de un Ab se puede sintetizar y posteriormente escindir de la resina, exponiendo así un grupo terminal que se bloquea funcionalmente en el otro fragmento. Por reacciones de condensación peptídica, estos dos fragmentos se puede unir de manera covalente vía un enlace peptídico a sus terminales C- y N-, respectivamente, para formar un Ab, o un fragmento del mismo. (Grunt, GA, Synthetic Peptides: A User Guide, W.H. Freeman and Co., N.Y. (1992); Bodansky, M et al., eds, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag Inc., N.Y. (1993)).

35 [0119] Se pueden seleccionar anticuerpos para propiedades deseadas particulares. En el caso de un Ab que se va a usar *in vivo*, los procedimientos de selección de Ab pueden incluir cualquier ensayo biológico *in vitro* o *in vivo* que mida la unión con, por ejemplo, el complejo uPA/uPAR o uPAR-integrina, con células expresando el polipéptido pertinente o epítipo peptídico. Por otra parte, los Abs se pueden seleccionar en varios modelos tumorales, tal como un modelo de ratón xenogénico en el que una línea celular tumoral humana que expresa el antígeno se cultiva en ratones inmunocomprometidos, por ejemplo desnudos.

#### 40 Anticuerpo diagnósticamente marcado

45 [0120] El término "diagnósticamente marcado" significa que el presente Ab se ha fijado una etiqueta diagnósticamente detectable. Hay muchas etiquetas y métodos de etiquetación diferentes conocidos por los expertos en la materia que se describen más adelante. Las clases generales de etiquetas que se puede usar en la presente invención incluyen isótopos radiactivos, isótopos paramagnéticos, y compuestos que se puede representar por tomografía de emisión de positrón (PET), compuestos coloreados o fluorescentes, etc. Las etiquetas detectables adecuadas incluyen etiquetas radiactivas, fluorescentes, fluorogénicas, cromogénicas u otras etiquetas químicas. Las etiquetas útiles (radionucleidos), que se detectan simplemente por gammámetro, contador de centelleo o autoradiografía incluyen <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S y <sup>14</sup>C. <sup>131</sup>I es también un isótopo terapéutico útil (ver más abajo).

55 [0121] Varias patentes estadounidenses divulgan métodos y composiciones para complejar metales en moléculas más grandes, incluyendo la descripción de agentes quelantes útiles. Los metales son preferiblemente átomos de metal detectables, incluidos radionúclidos, y se complejan para proteínas y otras moléculas. Estos documentos incluyen: las patentes estadounidenses 5 627 286; 5 618 513; 5 567 408; 5 443 816; y 5 561 220.

60 [0122] Las etiquetas comunes fluorescentes incluyen fluoresceína, rodamina, dansilo, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-fitaldehído y fluorescamina. El fluoróforo, tal como el grupo de dansilo, debe excitarse mediante luz de una longitud de onda particular para que emita fluorescencia. Ver, por ejemplo, Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Sixth Ed., Molecular Probes, Eugene, OR., (1996). La fluoresceína, los derivados de fluoresceína y las moléculas tipo fluoresceína tales como Oregon Green™ y sus derivados, Rhodamine Green™ y Rhodol Green™, se acoplan a grupos de amina que usan el isotiocianato, éster succinimidil o grupos reactivos con diclorotriazinilo. De forma similar, los fluoróforos pueden también acoplarse a tiolos usando maleimida, iodoacetamida y grupos reactivos con aziridina. Las rodaminas de longitud de onda larga, que son básicamente derivados de Rhodamine Green™ con sustituyentes en los nitrógenos, están entre los reactivos de etiquetación fluorescente fotoestable más conocidos. Sus espectros no están afectados por cambios en el pH entre 4 y 10, una ventaja importante sobre las

5 fluoresceínas para muchas aplicaciones biológicas. Este grupo incluye las tetrametilrodaminas, de X rodamina y Red™ de Texas a derivados. Otros fluoróforos preferidos para derivatizar el péptido según esta invención son los que se excitan por luz ultravioleta. Los ejemplos incluyen azul cascada, derivados de la cumarina, naftaleno (de los que el cloruro de dansilo es un elemento), pirenos y derivados del piridiloxazol. También se incluyen como etiquetas dos materiales inorgánicos relacionados que se han descrito recientemente: nanocristales semiconductores, incluyendo, por ejemplo, sulfato de cadmio (Bruchez, M et al., Science 281:2013-2016 (1998) y puntos cuánticos, por ejemplo, selenido de Cd cubierto por sulfuro de zinc (Chan, WC et al., Science 281:2016-2018 (1998)).

10 [0123] En otro método, el grupo de amino del Ab se deja reaccionar con reactivos que ceden productos fluorescentes, por ejemplo, fluorescamina, dialdehídos tales como o-ftaldialdehído, naftaleno-2,3-dicarboxilato y antraceno-2,3-dicarboxilato. Los derivados de 7-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol (NBD), tanto cloruro como fluoruro, son útiles para modificar aminas para producir productos fluorescentes.

15 [0124] El Ab de la invención se puede marcar también para la detección utilizando metales de emisión de fluorescencia tal como <sup>152</sup>Eu, u otros de la serie de lantánido. Estos metales se pueden fijar al péptido utilizando tales grupos quelantes de metales como ácido dietileno-triaminopentaacético (DTPA, véase ejemplo X, *infra*) o ácido etileno-diaminatetraacético (EDTA). DTPA, por ejemplo, está disponible como el anhídrido que puede fácilmente modificar los péptidos que contienen NH<sub>2</sub> de esta invención.

20 [0125] Para diagnóstico o terapia *in vivo*, los radionúclidos se pueden atar al Ab directa o indirectamente usando un agente quelante tal como DTPA y DOTA. Ejemplos de tales radionúclidos son <sup>99</sup>Tc, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>97</sup>Ru, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>72</sup>As, <sup>89</sup>Zr, <sup>90</sup>Y y <sup>201</sup>Tl. Generalmente, la cantidad de Ab marcado necesario para la detectabilidad en el uso diagnóstico variará dependiendo de consideraciones tales como edad, condición, sexo y extensión de la enfermedad en el paciente, contraindicaciones, si las hay, y otras variables, y debe ser ajustada por cada médico o diagnosticador. La dosificación puede variar de 0,001 mg/kg a 100 mg/kg.

30 [0126] El Ab puede hacerse también detectable por acoplamiento a un compuesto fosforescente o quimioluminiscente. La presencia del péptido etiquetado quimioluminiscente se determina después por detección de la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato. Asimismo, se puede utilizar un compuesto bioluminiscente para marcar los péptidos. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficiencia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina por detección de la presencia de luminiscencia. Compuestos bioluminiscentes importantes para fines de etiquetación son luciferino, luciferasa y aequorina.

35 [0127] En otra forma de realización, se usa la detección colorimétrica, basada en compuestos cromogénicos que tienen, o dan como resultado, cromóforos con coeficientes de extinción altos.

40 [0128] La detección *in situ* del péptido marcado se puede realizar eliminando una muestra histológica de un sujeto y examinando ésta por microscopía bajo condiciones apropiadas para detectar el marcador. Los versados en la materia percibirán fácilmente que cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tal como procedimientos de coloración) se puede modificar para conseguir tal detección *in situ*.

45 [0129] Para radioformación de imágenes *in vivo* de diagnóstico, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor principal en la selección de un radionucleido. El radionucleido elegido debe tener un tipo de deterioro que sea detectable por un instrumento particular. En general, cualquier método convencional para visualizar formación de imágenes de diagnóstico se puede utilizar conforme a esta invención. Otro factor en la selección de un radionucleido para diagnóstico *in vivo* es que su vida media sea lo suficientemente larga para que el marcador siga siendo detectable en el momento de máxima comprensión por el tejido objetivo, pero lo suficientemente corta suficiente para que la irradiación deletérea del huésped sea minimizada. En una forma de realización preferida, un radionucleido usado para la formación de imágenes *in vivo* no emite partículas, pero produce un gran número de fotones en un intervalo de keV de 140-200, que puede ser detectado fácilmente por cámaras gamma convencionales.

50 [0130] La formación de imágenes *in vivo* se puede utilizar para detectar metástasis oculta que no es observable por otros métodos. La formación de imágenes podría usarse, por ejemplo, para situar tumores de forma no invasiva.

Uso de anticuerpos para detectar complejos de uPA- o uPAR por inmunoensayo.

60 [0131] Los anticuerpos de esta invención son útiles en inmunoensayos para detectar moléculas que contienen estos epítomos en muestras de tejido o en un líquido biológico, tal como suero o plasma. Tales Abs detectarían el antígeno o un fragmento portando epítomo de los mismos. Así, si hay proteólisis en el ambiente tumoral se produce la liberación de los fragmentos o en el tejido.

[0132] Cualquier inmunoensayo convencional conocido en la técnica se puede emplear para este propósito, aunque se prefieren los inmunoensayos enzimáticos tales como ELISA. También se describen métodos de inmunoensayo en referencias citadas por encima.

5 [0133] Los inmunoensayos competitivos se utilizan típicamente para detectar moléculas en una muestra para ensayo que son ligandos para el complejo que puede imitar los mAbs en su especificidad de enlace, afinidad, capacidad, etc. En una forma de realización de un ensayo de enlace competitivo, se mide la cantidad de Ab atada al complejo (directa o indirectamente usando un anti-Ig marcado). La competencia (es decir, menor unión de Ab al complejo) en presencia de la muestra para ensayo es evidencia de que uno o más componentes de la muestra enlazan con el complejo. Se espera que más compuestos evaluados enlazarán con afinidades moderadas (aproximadamente 1-10  $\mu\text{M}$ )

10 [0134] En otra forma de realización, un soporte sólido, por ejemplo, una microplaca, se reviste con el mAb de interés. La muestra para ensayo se añade e incuba, por ejemplo, durante aproximadamente 30 minutos para permitir la unión de moléculas pertinentes al Ab. Las placas se lavan y el complejo, en la forma detectablemente marcada (p. ej.,... biotinilado), se añade como el ligando competitivo, y se le permite concurrir con la muestra para ensayo para unión al Ab. Un resultado "positivo" para la muestra para ensayo se expresará como menos unión de complejo marcado atado a la fase sólida. Este método, en el que la solución compleja y solución de muestra no se adicionan simultáneamente, evita los efectos de confusión de la muestra para ensayo enlazando directamente al complejo, porque cualquier muestra para ensayo presente debe primero ser capturada por el mAb inmovilizado. Preferiblemente, para asegurar que la unión es específica, se realizan una serie de diluciones para obtener una curva de dilución. Esto mostrará si, por ejemplo, hay un 50% menos de proporción de unión/señal con la mitad de la muestra. En ausencia de tales efectos de dilución, se puede concluir que múltiples entidades de unión están entrando en el ensayo. Los resultados son más rigurosos si las moléculas enlazando en el sitio de unión de mAb tienen afinidades similares.

25 Ensayos inmunohistoquímicos

[0135] Un ensayo preferido para detectar los antígenos en un tejido es por inmunohistoquímica, usando cualquier método de ensayo convencional, de los cuales la técnica está llena. Un ensayo preferido es uno descrito en los ejemplos por debajo. Para una descripción de tales métodos, ver, por ejemplo, Dabbs, DJ, Diagnostic Immunohistochemistry, Churchill Livingstone, 2001.

Inmunoensayos no histológicos

35 [0136] Los inmunoensayos preferidos son inmunoensayos enzimáticos (EIA, por su sigla en inglés) tales como ELISA, que emplean antígenos o inmovilizado Abs para soportes sólidos. Para las composiciones y métodos presentes, el soporte sólido es preferiblemente cualquier poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nilón, poliacrilamida, difluoruro de polivinilideno, celulosa natural, celulosa modificada, nitrocelulosa, agarosa y perlas magnéticas. En una forma de realización preferida, la superficie de poliestireno u otras placas multipocillos plásticas sirven como soporte sólido. En otra forma de realización, un soporte sólido en el que se fija el Ab o el antígeno en el fondo o se coloca holgadamente en los pocillos de las placas multipocillos. Las placas multipocillos en las que los fondos de los pocillos comprenden nitrocelulosa o un material de membrana similar y a través de las cuales se puede mover líquido bajo presión o vacío también pueden usarse.

45 [0137] Los inmunoensayos típicos y preferidos incluyen ensayos "con sentido" en los que el Ab inmovilizado en un soporte sólido se pone antes en contacto con la muestra siendo que se va a probar para enlazar o "extraer" el antígeno de la muestra por formación de un complejo de antígeno de Ab binario inmovilizado. Después de la incubación adecuada, el soporte sólido se lava para eliminar el residuo de la muestra de fluido, incluido el antígeno no unido, si lo hubiera, y luego se pone en contacto con la solución que contiene una cantidad desconocida de Ab marcado (que funciona como un "molécula reportera"). Después de una segunda incubación, que permite al Ab marcado complejarse con el antígeno inmovilizado a través del Ab no marcado, el soporte sólido se lava una segunda vez para eliminar el Ab marcado no-reaccionado y se mide el marcador inmovilizado. Este tipo de ensayo de sándwich con sentido puede ser un simple ensayo "sí/no" para determinar si el antígeno está presente o se puede hacer cuantitativo por comparación de la cantidad de Ab marcado inmovilizado con la cantidad inmovilizada cuando se usa una muestra estándar conteniendo una cantidad conocida de antígeno.

55 [0138] También pueden usarse los ensayos de sándwich llamados "antisentido" o "simultáneos". Un ensayo simultáneo implica un único paso de incubación ya que el Ab inmovilizado y el Ab marcado se agregan simultáneamente a la muestra. Después de la incubación apropiada, el soporte sólido se lava para eliminar el residuo de la muestra y del Ab marcado no-complejado. La presencia o cantidad de Ab marcado asociada al soporte sólido se determina después como en el ensayo de sándwich "con sentido" convencional anterior.

60 [0139] En un ensayo "antisentido", una solución de Ab marcado se añade a la muestra después de un periodo de incubación adecuada seguida de adición de Ab no marcado inmovilizado. Después de una segunda incubación, el material en fase sólida se lava de la forma convencional para liberarlo del residuo de la muestra y del Ab marcado no-reaccionado. La determinación de Ab inmovilizado asociado al soporte sólido se determinado después como en los ensayos "con sentido" y "simultáneo".

## Ensayo para la unión de anticuerpos a uPAR en células enteras

[0140] El Ab uPAR-objetivo y/o conjugado del mismo se evalúa fácilmente para unión a uPAR, preferiblemente por medición de la inhibición de la unión de [<sup>125</sup>I]DFP-uPA a uPAR en un ensayo de enlace a ligandos competitivo o directamente por etiquetado del Ab con [<sup>125</sup>I]. El ensayo puede emplear células enteras que expresen uPAR, por ejemplo líneas celulares tales como A2780 o HeLa. Un ensayo preferido se lleva a cabo de la siguiente manera. Las células (aproximadamente 5 x 10<sup>4</sup>/pocillo) se colocan en placas en el medio (p. ej., MEM con sales de Earl/10% FBS + antibióticos) en placas de 24-pocillos, después se incuban en una atmósfera de CO<sub>2</sub> con humedad al 5% hasta que las células alcanzan el 70% de confluencia. El uPA de alto peso molecular inactivado catalíticamente (DFP-uPA) es radioiodinado usando Iodo-gen<sup>®</sup> (Pierce) a una actividad específica de aproximadamente 250,000 cpm/μg. Las placas conteniendo células se enfrían después en hielo y las células se lavan dos veces (5 minutos cada una) con PBS/ 0,05% Tween-80 frío. Los Abs de prueba y/o conjugados de los mismos se diluyen en serie en PBS / 0,1% BSA/ 0,01% Tween-80 frío y se añaden a cada pocillo para un volumen final de 0,3mL 10 minutos antes de la adición del [<sup>125</sup>I]DFP-uPA. Cada pocillo recibe 9500 cpm de [<sup>125</sup>I]DFP-uPA a una concentración final de 0,2 nM). Las placas se incuban después a 4°C durante 2 hrs, tras ese tiempo las células se lavan 3x (5 minutos cada una) con PBS/ 0,05% Tween-80 frío. Se añade NaOH (1N) en cada pocillo en 0,5 mL para lisar las células, y la placa se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente o hasta que todas las células de cada pocillo se lisen como se determina por examen microscópico. El contenido de cada pocillo se aspira luego y se determinan las cuentas totales de cada pocillo usando un gammámetro. Cada compuesto se evalúa por triplicado y los resultados se expresan como un porcentaje del total de radioactividad medida en los pocillos que contienen [<sup>125</sup>I]DFP-uPA solo, que se toma como representación de la unión máxima (100%).

[0141] La inhibición de unión de [<sup>125</sup>I]DFP-uPA para uPAR está normalmente relacionada con la dosis, de manera que la concentración del compuesto de prueba necesaria para producir un 50% de inhibición de unión (el valor IC<sub>50</sub>), que está previsto que caiga en la parte lineal de la curva, se determina fácilmente. En general, los Abs y/o los conjugados de los mismos tienen valores IC<sub>50</sub> inferiores a aproximadamente 10<sup>-5</sup> M. Preferiblemente, los Abs y/o los conjugados de los mismos tienen valores IC<sub>50</sub> inferiores a aproximadamente 10<sup>-6</sup> M, más preferiblemente, inferiores a aproximadamente 10<sup>-7</sup> M.

## 30 Ensayos de actividad biológica de anticuerpos anti-uPAR u otros ligandos

[0142] Los expertos en la técnica apreciarán que los ensayos *in vitro* e *in vivo* son útiles para medir la actividad de los Abs de la invención o de conjugados de los mismos, como se describe en este caso, pretenden ser ilustrativos y en ningún modo exhaustivos ni limitativos.

## 35 Ensayo para migración de EC

[0143] Para estudios de migración de EC, los transpocillos se revisten con colágeno de tipo I (50 μg/mL) añadiendo 200 μL de la solución de colágeno por transpocillo, luego se incuban durante toda la noche a 37°C. Los transpocillos se ensamblan en una placa de 24 pocillos y se añade un quimioatrayente (por ejemplo; FGF-2) a la cámara de fondo en un volumen total de 0,8 mL de medios. Las ECs, tales como células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, por su sigla en inglés), que han sido separadas de cultivo de monoestrato utilizando tripsina, se diluyen a una concentración final de aproximadamente 10<sup>5</sup> células/ml con medios sin suero y 0,2 mL de esta suspensión celular se añade a la cámara superior de cada transpocillo. Los inhibidores que deben evaluarse se pueden adicionar tanto a las cámaras superiores como a las inferiores y se permite proceder a la migración durante 5 hrs en una atmósfera humedecida a 37°C. Los transpocillos son eliminados de la placa manchada usando DiffQuik<sup>®</sup>. Las células que no han migrado se retiran de la cámara superior mediante raspado con un hisopo y las membranas se separan, montadas en placas, y se cuentan bajo un campo de alta potencia (400x) para determinar el número de células emigradas.

## 50 Ensayo biológico de actividad anti-invasiva

[0144] La capacidad de las células tales como células tumorales o ECs (p. ej., células de carcinoma prostático humano PC-3) para invadir a través de una membrana basal reconstituida (Matrigel<sup>®</sup>) en un ensayo conocido como un sistema de ensayo de invasión de Matrigel<sup>®</sup> es bien conocido (Kleinman et al., Biochemistry 1986, 25: 312-318; Parish et al., 1992, Int. J. Cancer 52:378-383). Matrigel<sup>®</sup> es una membrana basal reconstituida que contiene colágeno de tipo IV, laminina, proteoglicanos de sulfato de heparano tales como perlecan (que enlazan a y localiza bFGF), vitronectina así como factor-β de crecimiento transformante (TGFβ), activador plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), activador plasminógeno tisular (tPA) y la serpina conocida como inhibidor de activador plasminógeno tipo 1 (PAI-1) (Chambers et al., Canc. Res. 1995, 55:1578-1585). Se acepta en la técnica que los resultados obtenidos en este tipo de ensayo para Abs y/o conjugados de los mismos u otros ligandos que apuntan a receptores o enzimas extracelulares son predictivos de la eficacia de estos Abs y/o conjugados de los mismos *in vivo* (Rabbani et al., Int. J. Cancer 1995, 63: 840-845).

[0145] Tales ensayos emplean insertos de cultivo de tejido en transpocillo. Las células invasivas se definen como células que atraviesan a través del Matrigel<sup>®</sup> y el aspecto superior de una membrana de policarbonato y se adhieren al fondo de la membrana. Los transpocillos (p. ej., de Costar) que contienen membranas de policarbonato (8,0 μm de tamaño de poro) se revisten con Matrigel<sup>®</sup> (p. ej., de investigación colaborativa), que ha sido diluido en PBS estéril a una concentración final de aproximadamente 75 μg/mL (p. ej., 60 μL de Matrigel<sup>®</sup> diluido por inserto), y colocado en los

pocillos de una placa de 24 pocillos. Las membranas se secan durante toda la noche en un armario de seguridad biológica, luego se rehidratan añadiendo 100  $\mu$ L de medio, por ejemplo, DMEM, suplementado con antibióticos durante 1 hora en una tabla vibradora. El DMEM se retira de cada inserto por aspiración y 0,8 mL de DMEM completo (+/10 % FBS y antibióticos) se añade en cada pocillo de la placa de 24 pocillos de manera que éste circunde el exterior del transpocillo ("cámara inferior"). El DMEM nuevo con antibióticos (100 $\mu$ L), plasminógeno de Glu humano (5  $\mu$ g/mL), y cualquier inhibidor que se vaya a evaluar se agrega a la parte superior, dentro del transpocillo ("cámara superior"). Las células que deben evaluarse se tripsinizan y resuspenden en DMEM+antibióticos y se añaden a la cámara superior del transpocillo a una concentración final de aproximadamente  $8 \times 10^5$  células/ml. El volumen final de la cámara superior se ajusta a 200  $\mu$ L. La placa ensamblada es incubada después en una atmósfera de CO<sub>2</sub> con humedad al 5% durante aproximadamente 72 horas. Tras la incubación, las células se fijan y manchan mediante DiffQuik<sup>®</sup> (mancha de Giemsa) y la cámara superior se rasca después usando un hisopo para eliminar el Matrigel<sup>®</sup> y cualquier célula que no haya invadido a través de la membrana. Las membranas se separan del transpocillo usando una cuchilla X-acto<sup>®</sup>, montada en láminas porta objeto usando Permount<sup>®</sup> y cubreobjetos, luego se cuentan bajo un microscopio usando alta potencia (p. ej., 400x). Un número medio de células invasoras de 5-10 campos contados se calcula y fija como función de concentración de inhibidor.

#### Ensayos de formación de tubo de actividad antiangiogénica

[0146] Las ECs, por ejemplo, las células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC) o células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC) que pueden prepararse u obtenerse comercialmente, se mezclan en una concentración de  $2 \times 10^5$  células/ml con fibrinógeno (5mg/ml en suero salino tamponado con fosfato (PBS) en una proporción 1:1 (v/v). Se añade trombina (5 unidades / mL concentración final) y la mezcla se transfiere inmediatamente a una placa de 24 pocillos (0,5 mL por pocillo). Se deja que se forme el gel de fibrina y luego se añaden VEGF y bFGF a los pocillos (cada uno en una concentración final de 5 ng/mL) con el compuesto de prueba. Las células se incuban a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> durante 4 días, momento en el que se cuentan las células de cada pocillo y se clasifican como redondeadas o alargadas sin derivaciones, alargado con una derivación, o alargadas con 2 o más derivaciones. Los resultados se expresan como el promedio de 5 pocillos diferentes para cada concentración de compuesto. Típicamente, en presencia de inhibidores angiogénicos, las células permanecen bien redondeadas o forman tubos indiferenciados (p. ej. 0 o 1 derivación). Este ensayo se reconoce en la técnica por ser predictivo de eficacia angiogénica (o antiangiogénica) *in vivo* (Min et al., Cancer Res. 1996, 56: 2428-2433).

[0147] En un ensayo alterno, se observa formación de tubos de EC cuando se cultivan ECs en el Matrigel<sup>®</sup> (Schnaper HW et al., J. Cell. Physiol. 1995, 165:107-118). Se transfieren 104 a EC /pocillo sobre placas de 24 pocillos revestidas de Matrigel<sup>®</sup>, y se cuantifica la formación de tubo después de 48 hrs. Los inhibidores se evalúan añadiéndolos bien cuando se añaden las ECs o en diferentes momentos después. También se puede estimular la formación de tubo añadiendo (a) un factor de crecimiento angiogénico tal como bFGF o VEGF, (b) un agente estimulante de diferenciación (por ejemplo, PMA) o (c) una combinación de éstos.

[0148] Aunque no se desea estar limitado por la teoría, esta angiogénesis de modelos de ensayo presentando a las ECs un tipo particular de membrana basal, a saber el estrato de matriz que migrando y diferenciando las ECs sería previsto que se encontrara primero. Además de los factores de crecimiento enlazados, los componentes matriciales encontrados en el Matrigel<sup>®</sup> (y en membranas basales *in situ*), o productos proteolíticos de los mismos, pueden también ser estimuladores para la formación de tubos de EC que hacen este modelo complementario del modelo de angiogénesis de gel de fibrina previamente descrito (Blood, CH et al., Biochim. Biophys. Acta 1990, 1032:89-118; Odedra, R et al., Pharmac. Ther. 1991, 49:111-124).

#### Ensayos para inhibición de proliferación celular

[0149] La capacidad de los Abs y/o conjugados de esta invención para inhibir la proliferación de ECs se pueden determinar en un formato de 96-pocillos. El colágeno de tipo I (gelatina) se utiliza para revestir los pocillos de la placa (0,1-1 mg/mL en PBS, 0,1 mL por pocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente). Después de lavar la placa (3x usando PBS),  $3-6 \times 10^3$  células se colocan en placas por pocillo y se les permite atarse durante 4 hrs (37°C/5% CO<sub>2</sub>) en el medio de crecimiento endotelial (EGM; Clonetics) o en el medio M199 suplementado con 0,1-2% FBS. El medio y cualquier células no atada se retiran al final de las 4 hrs y el medio nuevo suplementado con bFGF (1-10 ng/mL) o VEGF (1-10 ng/mL) se añade en cada pocillo. Los anticuerpos y/o conjugados que deben ser evaluados se agregan al final, y se incuban la placa (37°C/5% CO<sub>2</sub>) durante 24-48 hrs. El compuesto cromogénico MTS (Promega) se añade en cada pocillo y se deja incubar de 1-4 hrs. El color que se desarrolla en cada pocillo es directamente proporcional al número celular, sirviendo así como sustituto para contar células. La absorbancia leída en 490nm se utiliza para determinar las diferencias en números celulares, es decir, proliferación, entre pocillos de control y aquellos que contienen Abs de prueba y/o conjugados.

[0150] También puede usarse un ensayo similar utilizando células tumorales adherentes cultivadas. No obstante, el colágeno se puede omitir en este formato. Las células tumorales (p. ej.,  $3-10 \times 10^3$ /pocillo) se colocan en placas y se deja que se adhieran durante toda la noche. Después se añade medio sin suero y se fuerza a las células a sincronizar durante 24 hrs. Después se añade medio + 10% FBS en cada pocillo para estimular la proliferación. Los anticuerpos y/o

conjugados que se deben evaluar se incluyen en algunos de los pocillos. Después de 24 hrs, se añade MTS a la placa y el ensayo se desarrolla y lee como por encima.

Ensayos de citotoxicidad

5

[0151] Los efectos citotóxicos y anti-proliferativos de Abs y/o de sus conjugados se pueden determinar para varios tipos de células incluyendo células tumorales, ECs, fibroblastos y macrófagos. Esto es especialmente útil cuando se analiza un Ab que se ha conjugado con una fracción terapéutica tal como un radioterapéutico o una toxina. Por ejemplo, un conjugado de uno de los Abs de la invención con reactivo de Bolton-Hunter que ha sido iodado con <sup>131</sup>I se esperaría que inhibiera la proliferación de células expresando uPAR (muy probablemente induciendo apoptosis). Se esperarían efectos anti-proliferativos contra las células tumorales y células endoteliales estimuladas pero, bajo algunas circunstancias las células endoteliales inactivas o los fibroblastos dermales humanos normales. Cualquier efecto citotóxico o anti-proliferativo observado en las células normales puede representar toxicidad no-específica del conjugado.

10

15

[0152] Un ensayo típico implicaría células de metalización a una densidad de 5-10,000 células por pocillo en una placa de 96-pocillos. El compuesto que debe evaluarse se añade en una concentración 10x el IC<sub>50</sub> medido en un ensayo de enlace (este variará dependiendo del conjugado) y se deja incubar con las células durante 30 minutos. Las células se lavan 3X con medios, después medios nuevos que contienen [<sup>3</sup>H]timidina (1 µCi/mL) se añaden a las células y se les permite a incubar a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> durante 24 y 48 horas. Las células se lisan en los diferentes puntos de tiempo 1 M NaOH y se determinan las cuentas por pocillo usando un β-contador. La proliferación se puede medir no radioactivamente usando el reactivo MTS o CyQuant® para medir el número total de células. Para ensayos de citotoxicidad (lisis de célula de medición), se usa un equipo de citotoxicidad Promega de 96-pocillos. Si hay evidencia de actividad anti-proliferativa, la inducción de apoptosis se puede medir usando TumorTACS (Genzyme).

20

25

Ensayo de actividad de Caspasa-3

[0153] La capacidad de los Abs y/o conjugados para promover apoptosis de las ECs se puede determinar midiendo la activación de la caspasa-3. Se utiliza colágeno de tipo I (gelatina) para revestir una placa P100 y 5x10<sup>5</sup> ECs se siembran en EGM + 10% FBS. Después de 24 horas (a 37°C/5% CO<sub>2</sub>) el medio se sustituye por EGM + 2% FBS, 10 ng/ml bFGF y el compuesto de prueba deseado. Las células se cosechan después de 6 hrs, los lisatos celulares preparados en detergente 1% Tritón X-100, y los lisatos evaluados usando el kit de ensayo de Caspasa-3 #1 de EnzChek® (sondas moleculares) según las instrucciones del fabricante.

30

35

Modelo de angiogénesis corneal

[0154] El protocolo usado es esencialmente idéntico al descrito por Volpert, OV et al., J. Clin. Invest. 1996, 98: 671-679. Brevemente, ratas Fischer hembra (120-140 gms) se anestesian y se implantan gránulos (5 µl) compuestos de Hydron®, bFGF (150 mM), y los Abs y/o conjugados de los mismos que deben evaluarse en incisiones ínfimas hechas en la córnea 1,0-1,5 mm del limbo. La neovascularización se evalúa 5 y 7 días después de la implantación. En el día 7, los animales se anestesian y se les infunde un tinte tal como carbono coloidal para colorar los vasos. Después los animales son eutanasiados, las córneas se fijan con formalina, y las córneas se aplanan y se fotografían para valorar el grado de neovascularización. Los neovasos se pueden cuantificar por formación de imágenes del área o longitud de vaso total o simplemente contando los vasos.

40

45

Ensayo de angiogénesis de la membrana corioalantóica de polluelo (CAM, por su sigla en inglés)

[0155] Este ensayo se realiza esencialmente como se describe por Nguyen et al., Microvascular Res. 1994, 47:31-40. Una malla que contiene factores angiogénica (bFGF) o células tumorales más un compuesto de prueba, aquí los Abs anti-uPAR o conjugados, se colocó sobre la CAM de un embrión de polluelo de 8 días de edad y la CAM se observó durante 3-9 días después de la implantación de la muestra. La angiogénesis se cuantifica determinando el porcentaje de escuadras de la malla que contienen vasos sanguíneos visibles.

50

Ensayo de tapón de Matrigel®

[0156] Este ensayo se realiza esencialmente como describe Passaniti, A et al., 1992, Lab Invest. 67:519-528. Matrigel® enfriado con hielo (p. ej., 500 µL) (Collaborative Biomedical Products, Inc., Bedford, MA) se mezcla con heparina (p. ej., 50 µg/ml), FGF-2 (p. ej., 400 ng/ml) y el compuesto que debe evaluarse. En algunos ensayos, bFGF se puede sustituir por células tumorales como estímulo angiogénico. La mezcla de Matrigel® se inyecta subcutáneamente (s.c.) en ratones atímicos desnudos de 4-8 semanas de edad en sitios cerca de la línea media abdominal, preferiblemente 3 inyecciones por ratón. El Matrigel® inyectado forma un gel sólido palpable. Los sitios de inyección se eligen de manera que cada animal recibe un tapón de control positivo (tal como FGF2 + heparina), un tapón de control negativo (p. ej., tampón + heparina) y un tapón que incluye el compuesto del que se evalúa su efecto en la angiogénesis, por ejemplo, (FGF-2 + heparina + compuesto). Todos los grupos de tratamientos se ejecutan preferiblemente por triplicado. Los animales se sacrifican por dislocación cervical aproximadamente 7 días después de la inyección o en otro momento que pueda ser óptimo para observar angiogénesis. La piel de ratón se separa a lo largo de la línea media abdominal, y los tapones de Matrigel® se recuperan y escanean microscópicamente inmediatamente a alta resolución. Los tapones se dispersan

55

60

65

después en el agua y se incuban a 37°C durante toda la noche. Los niveles de hemoglobina (Hb) en los tapones se determinan usando la solución de Drabkin (p. ej., de Sigma) según las instrucciones de los fabricantes. La cantidad de Hb en el tapón es una medida indirecta de angiogénesis ya que refleja la cantidad de sangre en la muestra.

5 [0157] Además, o alternativamente, los animales pueden ser inyectados antes del sacrificio con un 0,1 ml de tampón (preferiblemente PBS) con un alto dextrano de peso molecular al que se conjuga un fluoróforo. La cantidad de fluorescencia en el tapón disperso, determinada fluorimétricamente, también sirve como medida de angiogénesis en el tapón. La coloración con mAb anti-CD31 (CD31 es, "molécula de adhesión celular endotelial de plaqueta", "PECAM") puede también usarse para confirmar la formación de neovasos y la densidad de microvasos en los tapones. Evaluación  
10 *in vivo* de la inhibición de angiogénesis y los efectos anti-tumorales utilizando el ensayo de tapón de Matrigel® con células tumorales

[0158] En este ensayo, las células tumorales, por ejemplo 1-5 x 10<sup>6</sup> células de carcinoma de pulmón de Lewis 3LL o la línea celular de próstata de rata MatLyLu, se mezclan con Matrigel® y luego se inyecta en el costado de un ratón siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Una masa de células tumorales y una respuesta angiogénica potente se puede observar en los tapones después de aproximadamente 5 a 7 días. La acción antiangiogénica y anti-tumoral de un compuesto en un entorno de tumor real se puede evaluar mediante su inclusión en el tapón. Después se miden el peso tumoral, los niveles de Hb o niveles de fluorescencia (de un conjugado de dextrano-fluoróforo inyectado antes de sacrificar). Para medir Hb o fluorescencia, los tapones se homogenizan primero con unos homogenizadores de tejido.  
15  
20

Modelos Xenograft de crecimiento tumoral subcutáneo

Carcinoma de ovario humano

25 [0159] La línea cancerosa de ovario humano A2780 se estableció a partir de tejido tumoral de un paciente no tratado. Las células A2780 se mantienen como un monoestrato en medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de glutamina, 0,01 mg/mL de insulina bovina y 10% de FBS. (Hamilton, TC et al., *Sem. Oncol.* 1984; 11:285-293; Behrens, BC et al., *Cancer Res.* 1987; 47: 414-418). Se inoculan dos millones de A2780 en el costado adecuado de ratones hembra Balb/c desnudos. El tumor A2780 se prepara en un intervalo de 50 a 200 mm<sup>3</sup> antes que el tratamiento. El Ab de control de IgG al igual que los mAbs de uPAR anti-D2D3 se administran por la vía intraperitoneal a 10 mg/kg dos veces por semana, los lunes y los viernes. El grupo de tratamiento de cisplatina fue preparado a 1000 mm<sup>3</sup>; los animales recibieron 6 mg/kg una vez a la semana. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces en semana. En el momento del sacrificio, se obtiene plasma y el tumor se extirpa de cada animal. La mitad del tumor se congela instantáneamente para evaluación bioquímica y el resto se coloca en fijador de zinc para evaluación histológica.  
30  
35

Carcinoma de pulmón humano

[0160] A549, línea celular de carcinoma de pulmón humano (ATCC n° catálogo CCL-185), fue establecido a través de cultivo de explantación de tejido carcinomatoso de pulmón hombre caucásico de 58 años (Giard, DJ et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 51:1417- 23 (1973)). Las células A549 se mantienen en el medio F12K de Ham suplementado con 2 mM de L-glutamina, 0,15% de NaHCO<sub>3</sub> y 10 % de FBS.  
40

[0161] Aproximadamente 10<sup>6</sup> células de carcinoma A549 se inoculan en el costado adecuado de C.B-17/Sys (*scid/scid*) ratones hembra con inmunodeficiencia combinada severa (SCID, por su sigla en inglés). El tratamiento se inicia preferiblemente el día después de la inoculación del tumor. El Ab de control de IgG (y el control de PBS) al igual que el mAb ATN-658 de uPAR anti-D2D3 se administra intraperitonealmente 10 mg/kg dos veces a la semana, los lunes y viernes. Inicialmente, los volúmenes tumorales se miden una vez a la semana. Cuando el volumen de cualquier grupo de tratamiento excede 300 mm<sup>3</sup>, se obtienen mediciones dos veces en semana.  
45  
50

[0162] En el momento del sacrificio, se obtiene plasma y el tumor se extirpa de cada animal. La mitad del tumor se congela instantáneamente para evaluación bioquímica y el resto se coloca en fijador de zinc para evaluación histológica.

Modelo de Xenograft de metástasis

55 [0163] Los Abs y/o conjugados se evalúan para inhibición de metástasis tardía utilizando un modelo de metástasis experimental tal como la de Crowley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90 5021-5025). La metástasis tardía implica los pasos donde las células tumorales se pegan y extravasan, invaden localmente, siembran, proliferan y inducen angiogénesis. Las células de carcinoma prostático humano (PC-3) modificadas con un gen indicador, preferiblemente el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), pero como alternativa con un gen que codifica las enzimas de acetiltransferasa de cloranfenicol (CAT), luciferasa o LacZ, se inoculan en ratones desnudos. Este método permite la utilización de cualquiera de estos marcadores (detección de fluorescencia de GFP o detección colorimétrica histoquímica de las diferentes enzimas) para seguir el destino de estas células. Las células se inyectan, preferiblemente iv, y se identifica metástasis después de aproximadamente 14 días, particularmente en los pulmones pero también en los ganglios linfáticos regionales, fémures y cerebro. Esto imita el tropismo orgánico de metástasis de origen natural en el cáncer de próstata humana. Por ejemplo, las células PC-3 que expresan GFP (10<sup>6</sup> células por ratón) se inyectan iv en las venas de la cola de ratones desnudos (nu/nu). Los animales se tratan con una composición de prueba a  
60  
65

100µg/animal/día dada q.d. IP. Las células metastásicas individuales y los focos se visualizan y cuantifican por microscopía de fluorescencia o histoquímica microscópica de luz o por trituración del tejido y ensayo cuantitativo colorimétrico del marcador detectable.

#### 5 Composiciones terapéuticas y farmacéuticas y su administración

10 [0164] Los compuestos que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo como por la reivindicación 1, al igual que las sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos. Las sales de adición ácidas farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención que contienen un grupo básico se forman donde los ácidos orgánicos o inorgánicos, no tóxicos, moderadamente fuertes por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de las sales de adición ácidas que se incluyen en esta invención son maleato, fumarato, lactato, oxalato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, tartrato, citrato, hidrocloreuro, hidrobromuro, sulfato, fosfato y sales de nitrato.

15 [0165] Las sales de adición básicas aceptables farmacéuticamente de compuestos de la invención que contienen un grupo ácido se preparan por métodos conocidos de bases inorgánicas y orgánicas e incluyen, por ejemplo, bases de metal alcalino no-tóxico y bases de tierra alcalina, tales como calcio, sodio, potasio e hidróxido de amonio; y bases orgánicas no-tóxicas tales como trietilamina, butilamina, piperazina y tri(hidroximetil)metilamina.

20 [0166] Como se ha explicado anteriormente, los compuestos de la invención poseen la capacidad de inhibir las propiedades de proliferación, motilidad o invasividad y angiogénesis de EC, que se aprovechan en el tratamiento contra el cáncer, en particular el cáncer metastásico. Una composición de esta invención puede ser activo *per se*, o puede actuar como un "profármaco" que se convierte *in vivo* en la forma activa.

#### 25 Composiciones terapéuticamente marcadas

30 [0167] En una forma de realización preferida, los mAbs descritos aquí están "terapéuticamente conjugados" o "terapéuticamente marcados" (términos que pueden ser intercambiables) y se usan para entregar un agente terapéutico al sitio en el que se albergan o enlazan los compuestos, tales como sitios de metástasis tumoral o focos de infección/inflamación, restenosis o fibrosis. El término "conjugado terapéuticamente" significa que el mAb modificado se conjuga con otro agente terapéutico que se dirige bien a la causa subyacente o a un "componente" de invasión, angiogénesis, inflamación u otra patología tumoral. Un polipéptido terapéuticamente marcado porta una "etiqueta" terapéutica adecuada también denominada, en este caso, como "fracción terapéutica". Una fracción terapéutica es un átomo, una molécula, un compuesto o cualquier componente químico añadido al péptido que lo rinde activo en el tratamiento de una enfermedad o condición objetivo, principalmente una asociada a angiogénesis indeseada. La fracción terapéutica puede estar atada directa o indirectamente al mAb. El mAb terapéuticamente marcado se administra como composición farmacéutica que comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable y está preferiblemente en una forma adecuada para inyección.

40 [0168] Ejemplos de radioisótopos terapéuticos útiles (ordenados por número atómico) incluyen  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  y  $^{217}\text{Bi}$ . Estos átomos se puede conjugar al péptido directamente, indirectamente como parte de un quelato, o, en el caso de yodo, indirectamente como parte de un grupo de Bolton-Hunter iodado. La radioyodina puede ser introducida bien antes o después de que este grupo se acople al compuesto peptídico.

45 [0169] Las dosis preferidas de los conjugados de radionucleido son una función de la radioactividad específica que se va a entregar al sitio objetivo que varía con el tipo tumoral, la ubicación y la vascularización tumoral, la cinética y biodistribución del peptídico portador, la energía de emisión radiactiva por el nucleido, etc. Los expertos en la técnica de radioterapia puede prontamente ajustar la dosis del péptido conjuntamente con la dosis del nucleido particular para obtener el beneficio terapéutico deseado sin experimentación excesiva.

50 [0170] Otro método terapéutico incluido aquí es el uso de terapia de captura de neutrones de boro, dónde un péptido borado se entrega a un sitio objetivo deseado, tal como un tumor, más preferiblemente un tumor intracraneal (Barth, RF, Cancer Invest. 14:534-550 (1996); Mishima, Y (ed.), Cancer Neutron Capture Therapy, New York: Plenum Publishing Corp., 1996; Soloway, AH et al., (eds), J. Neuro-Oncol. 33:1-188 (1997). El isótopo estable  $^{10}\text{B}$  se irradia con neutrones térmicos de baja energía (<0,025eV), y la captura nuclear resultante produce  $\alpha$ -partículas y  $^7\text{Li}$  núcleos que tienen alta transferencia lineal de energía y longitudes de recorrido respectivas de aproximadamente 9 y 5 µm. Este método se basa en acumulación de  $^{10}\text{B}$  en el tumor con niveles inferiores en sangre, en células endoteliales y en tejido normal (p. ej., cerebro). Tal entrega se ha realizado utilizando factor de crecimiento epidérmico (Yang. W et al., Cancer Res 57:4333-4339 (1997).

60 [0171] Otros agentes terapéuticos que se puede acoplar a los mAbs según el método de la invención son fármacos, profármacos, enzimas para activar profármacos, agentes fotosensibilizadores, tratamientos de ácido nucleico, vectores antisentido, vectores víricos, lectinas y otras toxinas.

65 [0172] Las lectinas son proteínas, comúnmente derivadas de plantas, que enlazan con carbohidratos. Entre otras actividades, algunas lectinas son tóxicas. Algunas de las sustancias más citotóxicas conocidas son toxinas proteínicas

- de origen bacteriano y vegetal (Frankel, AE et al., Ann. Rev. Med. 37:125-142 (1986)). Estas moléculas enlazan la superficie celular e inhiben la síntesis de proteína celular. Las toxinas vegetales más frecuentemente usadas son ricina y abrina; las toxinas bacterianas más comúnmente usadas son toxina diftérica y exotoxina A de *Pseudomonas*. En ricina y abrina, las funciones de unión y tóxicas se contienen en dos subunidades de proteína separadas, las cadenas A y B. La
- 5 cadena B de ricina se enlaza a los carbohidratos de la superficie celular y promueve la aceptación de la cadena A en la célula. Una vez dentro de la célula, la cadena A de ricina inhibe la síntesis de proteína mediante la inactivación de la subunidad 60S del ribosoma eucariota Endo, Y. et al., J. Biol. Chem. 262: 5908-5912 (1987)). Otras toxinas derivadas de plantas, que son proteínas inhibitorias ribosómicas monocatenarias, incluyen proteína antivírica de hierba carmín, proteína de germen de trigo, gelonina, diantinas, momorcarinas, tricosantina y muchas otras (Strip, F. et al., FEBS Lett. 195:1-8 (1986)). La toxina diftérica y la exotoxina A de *Pseudomonas* son también proteínas monocatenarias y sus
- 10 funciones de unión y toxicidad residen en dominios separados de la misma exotoxina A de *Pseudomonas* proteínica tiene la misma actividad catalítica que la toxina diftérica. La ricina se ha usado terapéuticamente por unión de su ?-cadena tóxica, con moléculas objetivo tales como Abs para permitir la entrega específica de sitio del efecto tóxico. Las toxinas bacterianas también se han usado como conjugados anti-tumorales. Como se propone aquí, una cadena de péptido tóxico o dominio se conjuga a un compuesto de esta invención y se entrega de manera específica de sitio en un sitio objetivo donde se desea actividad tóxica, tal como un foco metastásico. La conjugación de toxinas con proteína, tal como Abs o otros ligandos se conoce en la técnica (Olsnes, S. et al., Immunol. Today 10:291-295 (1989); Vitetta, ES et al., Ann. Rev. Immunol. 3:197-212 (1985)).
- 20 [0173] Los fármacos citotóxicos que interfieren con procesos críticos celulares incluyendo ADN, ARN y síntesis de proteína, se han conjugado con Abs y posteriormente se han usado para terapia *in vivo*. Tales fármacos, incluyendo, pero no limitados a, daunorubicina, doxorubicina, metotrexato y mitomicina C también se acoplan a los compuestos de esta invención y se utilizan terapéuticamente de esta forma.
- 25 [0174] Los compuestos de la invención, al igual que las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden incorporar en formas de dosificación convenientes, tales como cápsulas, obleas impregnadas, comprimidos o preparaciones inyectables. Se pueden emplear portadores farmacéuticamente aceptables sólidos o líquidos.
- [0175] Los portadores sólidos incluyen almidón, lactosa, dihidrato de sulfato de calcio, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio y ácido esteárico. Los portadores líquidos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, solución salina, agua, dextrosa, glicerol y similares. De forma similar, el portador o diluyente puede incluir cualquier material de liberación prolongada, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de gliceril, solo o con una cera. Cuando se usa un portador líquido, la preparación puede ser en forma de un jarabe, elixir, emulsión, cápsula de gelatina blanda, líquido estéril inyectable (p. ej., una solución), tal como una ampolla, o una suspensión acuosa o no acuosa líquida. Se puede encontrar un resumen de tales composiciones farmacéuticas, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (Gennaro 18th ed. 1990).
- 30 [0176] Los productos farmacéuticos se hacen siguiendo las técnicas convencionales de química farmacéutica implicando pasos tales como mezcla, granulación y compresión, cuando es necesario para formas de pastilla, o mezcla, relleno y disolución de los ingredientes, como sea apropiado, para dar los productos deseados por administración oral, parenteral, tópica, transdérmica, intravaginal, intrapene, intranasal, intrabronquial, intracraneal, intraocular, intraaural y rectal. Las composiciones farmacéuticas puede también contener cantidades menores de sustancias no-tóxicas auxiliares tales como humidificación o agentes emulsionantes, agentes tamponadores de pH, etcétera.
- 40 [0177] La presente invención se puede utilizar en el diagnóstico o tratamiento de cualquier número de géneros animales y especies, y es igualmente aplicable en la práctica de medicina humana o veterinaria. Así, las composiciones farmacéuticas puede utilizarse para tratar animales domésticos y comerciales, incluidos pájaros y más preferiblemente mamíferos, al igual que seres humanos.
- 45 [0178] El término "administración sintética" se refiere a la administración de una composición o agente tal como el polipéptido, descrito aquí, de modo que produzca la introducción de la composición en el sistema circulatorio del sujeto o, de otra manera, permita su extensión en todo el cuerpo, tal como la inyección o infusión intravenosa (i.v.). La administración "regional" se refiere a la administración en un espacio anatómico específico, y de alguna forma más limitado, tal como, intraperitoneal, intratecal, subdural o en un órgano específico. Los ejemplos incluyen intravaginal, intrapene, intranasal, intrabronquial (o inspiración de pulmón), intracraneal, intraocular o intraaural. El término "administración local" se refiere a la administración de una composición o fármaco en un espacio anatómico limitado, o circunscrito, tal como inyección intratumoral en una masa tumoral, inyecciones subcutáneas (s.c.), inyecciones intramuscular (i.m.). El experto en la técnica entendería que la administración local o administración regional frecuentemente también suponen la introducción de una composición en el sistema circulatorio, es decir, de modo que s.c. o i.m. son también vías para administración sistémica. Las preparaciones infusibles o inyectables se pueden preparar en formas convencionales, bien como soluciones o suspensiones, formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en líquido antes de la inyección o infusión, o como emulsiones. Aunque las vías preferidas de administración son sistémicas, tal como i.v., la composición farmacéutica se puede administrar tópicamente o por vía transdérmica, por
- 50 ejemplo, como una pomada, crema o gel, oralmente, por vía rectal, por ejemplo, como un supositorio.
- 55
- 60
- 65

[0179] Para la aplicación tópica, el compuesto se puede incorporar en vehículos tópicamente aplicados tales como un ungüento o pomada. El portador para la sustancia activa puede ser bien en forma no pulverizable o pulverizable. Las formas no pulverizables pueden ser semi-sólidas o sólidas incluyendo un portador autóctono para la aplicación tópica y con una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que la del agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, pero de forma no limitativa, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, bálsamos y similares. Si se desea, estos se puede esterilizar o mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, conservantes, estabilizadores, agentes de humidificación, tampones o sales para presión osmótica de influencia y similares. Los vehículos preferidos para las preparaciones no pulverizables tópicos incluyen bases de pomada, por ejemplo, polietileno glycol-1000 (PEG-1000); cremas convencionales tales como crema HEB, geles, al igual que jalea de petróleo y similares.

[0180] También son adecuados para la aplicación tópica, al igual que para la inspiración pulmonar, las preparaciones de aerosol pulverizables donde el compuesto, preferiblemente en combinación con un material portador inerte sólido o líquido, se envasa en una botella de presión o en una mezcla con un propulsor presurizado volátil, normalmente gaseoso. Las preparaciones de aerosol pueden contener solventes, tampones, tensioactivos, perfumes, y/o antioxidantes, además de los compuestos de la invención.

[0181] Para las aplicaciones preferidas tópicos, especialmente para los seres humanos, se prefiere administrar una cantidad eficaz del compuesto en un área afectada, por ejemplo, superficie de piel, membrana mucosa, ojos, etc. Esta cantidad generalmente varía de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1 g por aplicación, dependiendo del área que se va a tratar, la gravedad de los síntomas y la naturaleza del vehículo tópico empleado.

[0182] Otros soportes aceptables farmacéuticamente para las composiciones de polipéptido de la presente invención son liposomas, composiciones farmacéuticas en las que la proteína activa se contiene bien dispersa o de diversas maneras presente en corpúsculos que consisten en estratos acuosos concéntricos adherentes a estratos lípidos. El polipéptido activo está preferiblemente presente en el estrato acuoso y en el estrato lípido, interior o exterior, o, de cualquier manera, en el sistema no homogéneo generalmente conocido como una suspensión liposómica. El estrato hidrofóbico, o estrato lípido, generalmente, pero no exclusivamente, comprende fosfolípidos tales como lecitina y esfingomielina, esteroides tales como colesterol, sustancias activas de superficie más o menos iónica tales como dicetilfosfato, estearilamina o ácido fosfatídico, y/o otros materiales de una naturaleza hidrofóbica. Los expertos en la técnica apreciarán otras formas de realización adecuadas de las presentes formulaciones liposómicas.

[0183] Las composiciones terapéuticas para tratar tumores y cáncer pueden comprender, además del péptido, uno o más agentes adicionales anti-tumorales, tales como inhibidores mitóticos, por ejemplo, vinblastina; agentes de alquilante, por ejemplo, ciclofosfamida; inhibidores de folato, por ejemplo, metotrexato, piritrexim o trimetrexato; antimetabolitos, por ejemplo, 5-fluorouracil y arabinósido de citosina; antibióticos intercalantes, por ejemplo, adriamicina y bleomicina; enzimas o inhibidores enzimáticos, por ejemplo, asparaginasa, inhibidores de topoisomerasa tal como etoposida; o modificadores de respuesta biológica, por ejemplo, interferones o interleukinas. De hecho, las composiciones farmacéuticas que comprenden cualquier tratamiento de cáncer conocido en combinación con el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1 están dentro del campo de esta invención. La composición farmacéutica puede también comprender uno o más medicamentos para tratar síntomas adicionales que puedan sufrir los pacientes objetivo, por ejemplo, anti-infectivos incluyendo agentes antibacterianos, anti-fúngicos, antiparasitarios, antivíricos y anticoccidiales.

[0184] La dosificación terapéutica administrada es una cantidad que es terapéuticamente eficaz, como se conoce o es fácilmente comprobable por aquellos expertos en la técnica. La dosis también depende de la edad, salud y peso del receptor, tipo de tratamiento(s) concurrentes, si los hay, la frecuencia de tratamiento y la naturaleza del efecto deseado, tal como, por ejemplo, efectos anti-inflamatorios o efecto antibacteriano.

#### Métodos terapéuticos

[0185] Los compuestos de esta invención pueden utilizarse para inhibir el crecimiento tumoral y la invasión en un sujeto o para suprimir la angiogénesis inducida por tumores mediante la inhibición del crecimiento y la migración celular endotelial. Al inhibir el crecimiento o la invasión de un tumor o angiogénesis, el uso de estos compuestos produce inhibición de metástasis tumoral. A un sujeto vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano, se le administra una cantidad del compuesto eficaz para inhibir el crecimiento, la invasión o la angiogénesis tumoral. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra preferiblemente en forma de composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

[0186] Las dosis de los Abs preferiblemente incluyen unidades de dosificación farmacéutica que incluyen una cantidad eficaz del péptido. La forma unitaria de dosificación se refiere a unidades físicamente específicas adecuadas como dosificaciones unitarias para un sujeto mamífero; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención se dictan por y dependen directamente de (a) las únicas características del material activo y el efecto terapéutico particular que se debe conseguir y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de combinación de tal compuesto activo para el tratamiento y la sensibilidad de sujetos individuales

5 [0187] Por una cantidad eficaz se entiende una cantidad suficiente para conseguir una concentración estable *in vivo* que produzca una reducción medible en cualquier parámetro pertinente de la enfermedad y que pueda incluir crecimiento de tumor metastásico o primario, cualquier índice aceptado de reactividad inflamatoria o una prolongación medible de intervalo sin enfermedad o de supervivencia. Por ejemplo, una reducción en el crecimiento tumoral en el 20 % de los pacientes se considerada eficaz (Frei III, E., The Cancer Journal 3: 127-136 (1997)). No obstante, un efecto de esta magnitud no se considera un requisito mínimo para que la dosis sea eficaz conforme a esta invención.

10 [0188] En una forma de realización, una dosis efectiva es preferiblemente 100 veces más alta que el 50% de dosis efectiva (ED50) del compuesto en un ensayo *in vivo* como se describe en este caso.

15 [0189] La cantidad de compuesto activo que se administra depende del Ab preciso o derivado seleccionado, la enfermedad o condición, la forma de administración, la salud y el peso del receptor, la existencia de otro tratamiento concurrente, si lo hay, la frecuencia de tratamiento, la naturaleza del efecto deseado, por ejemplo, la inhibición de metástasis tumoral, y la decisión del profesional experto.

20 [0190] Una dosis preferida para tratar a un sujeto, preferiblemente mamífero, más preferiblemente humano, con un tumor es una cantidad de hasta aproximadamente 100 miligramos de compuesto activo basado en polipéptido por kilogramo de peso corporal. Una dosificación típica única del compuesto está entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 100mg/kg de peso corporal. Para la administración tópica se sugieren las dosificaciones en el intervalo de aproximadamente 0,01-20% de concentración (por peso) del compuesto, preferiblemente 1-5%. Una dosificación total diaria en el intervalo de aproximadamente 0,1 miligramos para aproximadamente 7 gramos se prefiere para la administración intravenosa. Los intervalos precedentes son, no obstante, sugestivos, dado que el número de variables en un régimen de tratamiento individual es grande, y se esperan excursiones considerables de estos valores preferidos.

30 [0191] Una cantidad eficaz o dosis del Ab para inhibir la proliferación o migración celular endotelial *in vitro* está en el intervalo de aproximadamente 1 picogramo a aproximadamente 5 nanogramos por célula. Los intervalos de dosis eficaces y de dosis óptimas se pueden determinar *in vitro* usando los métodos descritos aquí.

35 [0192] Los compuestos de la invención se pueden caracterizar como productores de un efecto inhibitorio en la célula tumoral o proliferación celular endotelial, migración, invasión o en la angiogénesis, en la metástasis tumoral o en las reacciones inflamatorias. Los compuestos son especialmente útiles en la producción de un efecto anti-tumoral en un huésped mamífero, preferiblemente humano, albergando un tumor donde la inhibición de angiogénesis produce reducción en el índice de tamaño o de crecimiento del tumor o destrucción del tumor. Preferiblemente, el sujeto es un humano.

40 [0193] Un ejemplo más largo de una enfermedad o condición contra la cual el método anterior es eficaz incluye crecimiento primario de un tumor sólido, leucemia o linfoma; invasión tumoral, metástasis o crecimiento de metástasis tumoral; hiperplasia benigna; aterosclerosis; angiogénesis de miocardio; restenosis vascular de angioplastia post-balón formación de neoíntima tras traumatismo vascular; restenosis de injerto vascular; formación coronaria colateral; trombosis profunda venal; angiogénesis de brazo isquémico; telangiectasia; granuloma de piógeno; enfermedad corneal; rubeosis; glaucoma neovascular; retinopatía diabética y otra; fibroplasia retrolental; neovascularización diabética; degeneración macular; endometriosis; artritis; fibrosis asociada a una condición inflamatoria crónica, daño traumático de médula espinal incluyendo isquemia, cicatrización o fibrosis; fibrosis de pulmón, fibrosis inducida por quimioterapia; herida en curación con cicatriz y fibrosis; úlceras pépticas; una fractura de hueso; queloides; o un trastorno de vasculogénesis, hematopoyesis, ovulación, menstruación, embarazo o placentación asociado a invasión celular patógena o con angiogénesis.

50 [0194] Una enfermedad preferida o condición para tratar por el método anterior es el crecimiento, invasión o metástasis tumoral. Esto incluye tumores cerebrales. Ejemplos de tales tumores cerebrales son astrocitoma, astrocitoma anaplástico, glioblastoma, glioblastoma multiforme, astrocitoma pilocítico, xantastrocitoma pleiomórfico, astrocitoma de célula de gigante subependimal, astrocitoma fibrilar, astrocitoma gemistocítico, astrocitoma protoplásmico, oligodendroglioma, oligodendroglioma anaplástico, ependimoma, ependimoma anaplástico, ependimoma mixopapilar, subependimoma, oligoastrocitoma mezclado y oligoastrocitoma maligno.

60 [0195] El método también se usa para tratar una enfermedad uterina tal como la endometriosis y la neovascularización patógena ocular tal como la asociada con, o causada por, retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular neovascular relacionada con la edad, retinopatía de premadurez, retinopatía celular falciforme u oclusión de vena retinal.

65 [0196] Los inhibidores de angiogénesis pueden desempeñar un papel en la prevención de la angiogénesis inflamatoria y la gliosis tras una lesión en la espina dorsal traumática, promoviendo así el restablecimiento de la conectividad neuronal (Wamil, AW et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 95:13188-13193 (1998)). Por lo tanto, las composiciones de la presente invención se administran lo antes posible después de una lesión traumática de médula espinal y durante varios días hasta aproximadamente dos semanas después para inhibir la angiogénesis y gliosis que estéricamente prevendrían el

restablecimiento de la conectividad neuronal. El tratamiento reduce el área de daño en el sitio de lesión de la médula espinal y facilita la regeneración de función neuronal e impide así la parálisis. Los compuestos de la invención se espera que protejan también los axones de la degeneración walleriana, despolarización inversa mediada por aminobutirato (ocurriendo en neuronas traumatizadas), y mejoren la recuperación de conductividad neuronal de células y tejido del sistema nervioso central aisladas en el cultivo.

#### Métodos de ADN recombinante generales

[0197] Los métodos generales de biología molecular se han descrito ampliamente en la técnica (Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd (or later) Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Ausubel, F et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Wiley-Interscience, New York, (current edition); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); Glover, DM, ed., *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II, IRL Press, 1985; Alberts, B. et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th (or later) Ed., Garland Publishing, Inc., New York, NY (2002); Watson, JD et al., *Recombinant DNA*, 2nd Ed. (or later) Ed., WH Freeman & Co.; 2nd edition (1993); and Old, RW et al., *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*, 5th (or later) ed., Univ. of Calif. Press, Berkeley (1994).

[0198] A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácidos nucleicos particular se destina a encerrar variantes de sustitución conservadora de los mismos (p. ej., degenerar sustituciones de codón) y una secuencia complementaria. El término "ácido nucleico" es sinónimo de "polinucleótido" y se destina a incluir un gen, una molécula de ADNc, una molécula ARNm, al igual que un fragmento de cualquiera de éstos, tal como un oligonucleótido, y además, equivalentes de los mismos (se explica más ampliamente más abajo). Los tamaños de ácidos nucleicos se expresan bien en kilobases (kb) o en pares de bases (pb). Estos son consideraciones derivadas de electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa (PAGE), a partir de secuencias de ácidos nucleicos que determina el usuario o se publican. El tamaño de la proteína se expresa como masa molecular en kilodaltones (kDa) o como longitud (número de residuos de aminoácido). El tamaño de la proteína se expresa a partir de PAGE, de secuenciación, de secuencias de aminoácidos presuntas basadas en la secuencia de ácidos nucleicos de codificación o de secuencias de aminoácidos publicadas.

[0199] Específicamente, las moléculas de ADN que codifican la secuencia de aminoácidos correspondiente a los Abs de la presente invención, o variantes activas de las mismas, se pueden sintetizar por reacción en cadena de polimerasa (PCR) (ver, por ejemplo, patente estadounidense n°. 4 683 202) utilizando cebadores derivados de la secuencia de la proteína descrita aquí. Estas secuencias de ADNc se pueden después ensamblar en un vector de expresión eucariota o procariontico y el vector resultante puede utilizarse para dirigir la síntesis del polipéptido de fusión o su fragmento o derivado por células huésped apropiadas, por ejemplo células COS o CHO.

[0200] El término "ácido nucleico", como se utiliza en este caso, pretende incluir tales fragmentos o equivalentes. Las secuencias de ácidos nucleicos de esta invención pueden ser ADN o ARN.

[0201] Las células huésped eucarióticas o procarionticas transformadas o modificadas para expresar los presentes Abs están dentro del ámbito de la invención. Por ejemplo, el Ab se puede expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (baculovirus), levadura o células mamíferas tales como de células de ovario de hámster chino (CHO) o células humanas (que se prefieren para el uso terapéutico humano de las células modificadas). Otros huéspedes adecuados son conocidos por los expertos en la técnica. La expresión en células eucarióticas conduce a glicosilación completa o parcial y/o a formación de enlaces de disulfuro de la cadena interior o exterior pertinente del Ab recombinante. Ejemplos de vectores para expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari et al., 1987, *EMBO J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan et al. 1982 *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., 1987, *Gene* 54:113-123), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.). Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (células SF 9) incluyen las series pAc (Smith et al., 1983, *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) and las series pVL (Lucklow et al., (1989) *Virology* 170:31-39). Generalmente, las células COS (Gluzman 1981 *Cell* 23:175-182) se usan en conjunción con vectores tales como pCDM 8 (Arufoet al., *supra*), para amplificación/expresión transitoria en células mamíferas, mientras que las células CHO (CHO dhfr-negativo) se usan con vectores tales como pMT2PC (Kaufman et al., 1987, *EMBO J.* 6:187-195) para amplificación/expresión estable en células mamíferas. La línea celular de mieloma NS0 (un sistema de expresión de glutamina sintetasa) está disponible de Celltech Ltd.

[0202] La construcción de vectores adecuados conteniendo la codificación deseada y las secuencias de control emplea ligamiento estándar y técnicas de restricción que son bien entendidas en la técnica. Los plásmidos aislados, las secuencias de ADN o los oligonucleótidos sintetizados se dividen, confeccionan y ligan de nuevo en la forma deseada. Las secuencias de ADN que forman los vectores están disponibles de varias fuentes. Los vectores de columna vertebral y los sistemas de control se encuentran generalmente en vectores "huésped" disponibles que se usan para el grueso de las secuencias en construcción. Para la secuencia codificante pertinente, la construcción inicial puede ser, y normalmente es, una cuestión de recuperar las secuencias apropiadas de genotecas de ADNc o de ADN genómico. No obstante, una vez que la secuencia está descrita es posible sintetizar la secuencia de genes entera *in vitro* empezando por los derivados de nucleótido individuales. La secuencia de genes entera para genes de longitud en el intervalo de 500-1000 par de bases se puede preparar por sintetización individual superponiendo oligonucleótidos complementarios y relleno en partes monocatenarias no superpuestas utilizando polimerasa de ADN en presencia de los trifosfatos de

desoxirribonucleótido. Este método ha sido usado con éxito en la construcción de diferentes genes de secuencia conocida. Ver, por ejemplo, Edge, *Nature* 1981, 292:756; Nambair et al., *Science* 1984, 223:1299; and Jay, *J. Biol. Chem.* 1984, 259:6311. Los oligonucleótidos sintéticos se preparan por métodos descritos en referencias citadas por encima o por Beaucage et al., *Tetrahedron Lett.* 1981, 22:1859; and Matteucci et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103:3185.

[0203] Los componentes de los vectores deseados se pueden cortar y ligar usando restricción estándar y procedimientos de ligamiento. La escisión de ADN específico de sitio se realiza por tratamiento con la enzima de restricción adecuada (o enzimas) bajo condiciones que son generalmente entendidas en la técnica, y con los datos que especifica el fabricante de estas enzimas de restricción disponibles comercialmente. Ver, por ejemplo, New England Biolabs, catálogo de producto. Si se desea, la separación de tamaño de los fragmentos divididos se puede realizar por gel de poliacrilamida estándar o técnicas de electroforesis de gel de agarosa (e.g., *Meth. Enzymol.* (1980) 65:499-560).

[0204] Se utiliza cualquiera de una variedad de métodos para introducir mutaciones en la secuencia codificante para generar variantes si éstas se tienen que producir de manera recombinante. Estas mutaciones incluyen delecciones o inserciones simples, delecciones, inserciones o sustituciones sistemáticas de agrupaciones de bases o sustituciones de bases únicas. La modificación de la secuencia de ADN por mutagénesis dirigida al sitio es una técnica bien conocida para la que hay protocolos y reactivos comercialmente disponibles (Zoller et al., *Nucleic Acids Res.* 1982, 10:6487-6500; Adelman et al., *DNA* 1983, 2:183-193). El ADN aislado se analiza por restricción y/o secuenciado por el método dideoxi nucleótido (Sanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, 74:5463; Messing, et al., *Nucleic Acids Res.* 1981, 9:3091 o Maxam et al., *Meth. Enzymol.*, *supra*).

[0205] El ADN de vector se puede introducir en células mamíferas vía técnicas convencionales tales como coprecipitación de fosfato cálcico o cloruro de calcio, transfección mediada por dextrano DEAE, lipofección o electroporación. Se pueden encontrar métodos adecuados para transformación de células huésped en Sambrook et al. *supra* y otros textos estándar. En los vectores de expresión de fusión, un sitio de escisión proteolítica se introduce en la conjunción del grupo indicador y la proteína objetivo para permitir la separación de la proteína objetivo del grupo indicador después de la purificación de la proteína de fusión. Las enzimas proteolíticas para este tipo de escisión y sus secuencias de reconocimiento incluyen Factor Xa, trombina y enteroquinasa.

[0206] Habiendo ya descrito generalmente la invención, la misma se entenderá más fácilmente a través de la referencia a los ejemplos siguientes que se proporcionan como ilustración, y no pretenden ser limitativos de la presente invención, a menos que se especifique lo contrario.

#### EJEMPLO I

##### Materiales y métodos

##### Proteínas de expresión de líneas celulares

[0207] El Sistema de expresión de drosophila (DES™; Invitrogen, Inc.) utiliza la línea celular Schneider 2 (S2), derivada de *Drosophila melanogaster*, y los vectores plásmidos para la expresión de proteínas heterólogas. Los vectores plásmidos para expresión en células S2 son muy versátiles, permitiendo la expresión inducible de una proteína conducida por el promotor de metalotioneína (MT). El mismo plásmido también permite que la proteína se segregue desde la célula a los medios circundantes, simplificando inmensamente la purificación de la proteína. Se pueden insertar de forma estable múltiples copias del vector en el ADN genómico de las células S2, aumentando los niveles de la expresión de la proteína. Las proteínas expresadas en las células S2 son mínimamente glicosiladas, lo que es importante para la generación de Abs dirigidos contra el componente proteínico de uPAR. Rendimientos típicos de la proteína tras la purificación son 25-50 mg/L con una pureza de aproximadamente 95 por ciento (Figura 1). Las líneas celulares que expresan las siguientes proteínas han sido generadas: suPAR, D1, D2D3, scuPA, ATF1-143; ATF1-135; Kringle47-143, y Kringle47-135. Además, se han generado clones de suPAR en los que los sitios de glicosilación unidos a -N se han anulado.

##### Reactivos

Se adquirió <sup>125</sup>I como Na <sup>125</sup>I (480-630 MBq [13-17 DCL] por µg yodo) de Amersham Corp.

##### Líneas celulares tumorales

[0208] Se utilizaron las siguientes líneas celulares y tumorales: A549, HeLa y A2780. La línea de cáncer de ovario humano A2780 se estableció a partir de tejido tumoral de un paciente no tratado. Las células A2780 se mantienen como un monoestrato en el medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de glutamina, 0,01 mg/mL de insulina bovina y 10% (*supra*) de FBS. A549, carcinoma de pulmón humano, n° de catálogo de ATCC. CCL-185, anteriormente descrito, se mantienen en el medio F12K de Ham suplementado con 2 mM L-glutamina, 0,15% de NaHCO<sub>3</sub> y 10 % de FBS.

[0209] Las células A2780 (2x10<sup>6</sup>) fueron inoculadas en el costado derecho de ratones hembra Balb/c desnudos. El tumor se representó en un intervalo de 50 a 200 mm<sup>3</sup> antes de iniciar el tratamiento. El Ab de control de IgG al igual que

los mAbs de uPAR anti-D2D3 fueron administrados intraperitonealmente a 10 mg/kg dos veces por semana, los lunes y viernes. El grupo de tratamiento de cisplatina se representó en 1000 mm<sup>3</sup> à; los animales recibieron 6 mg/kg una vez a la semana. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces en semana.

5 [0210] Las células de carcinoma A549 (10<sup>6</sup>) fueron inoculadas en el costado derecho de C.B-17/Sys (*scid/scid*) ratones hembra (*scid*: inmunodeficiencia combinada severa). El tratamiento comenzó el día después de la inoculación del tumor. El Ab de control de IgG (y el control de PBS) al igual que el mAb ATN-658 de uPAR anti-D2D3 fueron administrados intraperitonealmente 10 mg/kg dos veces a la semana, los lunes y viernes. Inicialmente, los volúmenes tumorales se midieron una vez a la semana. Cuando el volumen de cualquier grupo de tratamiento excedió 300 mm<sup>3</sup>, las mediciones se obtuvieron dos veces en semana.

[0211] En el momento del sacrificio, se obtuvo plasma y el tumor se extirpó de cada animal. La mitad del tumor se congeló instantáneamente para evaluación bioquímica y el resto se colocó en fijador de zinc para evaluación histológica.

15 EJEMPLO II

mAbs Anti-D2D3

20 [0212] La inmunización de ratones Balb/c con el dominio D2D3 de suPAR recombinante conjugado a KLH generó una respuesta inmunitaria robusta. Los experimentos de fusión posteriores generaron clones parentales con reactividad cruzada específica con el dominio D2D3 de uPAR como determinó la transferencia de Western y los ensayos ELISA utilizando proteínas recombinantes. Estos clones parentales se sometieron a dilución limitante y se obtuvo un panel de mAbs específicos para D2D3. Las propiedades de cuatro de estos Abs se resumen en la tabla 3. La isotipografía identificó todos los clones como IgG1, ?. La especificidad para uPAR se confirmó por transferencia de Western. La afinidad de los Abs se determinó utilizando ensayos de unión directa. El mayoría de clones tienen afinidades de 1 a 5 nM.

Tabla 3: Anticuerpos anti-D2D3 (uPAR)

Clone #	Isotipo	Transferencia de Western (suPAR)	K <sub>D</sub> (nM)
ATN-615	IgG1, κ	+	2
ATN-658	IgG1, κ	+	1
ATN-616	IgG1, κ	+	5
ATN-617	IgG1, κ	+	3

30 [0213] Los resultados de los experimentos de transferencia de Western utilizando dos de estos Abs, ATN-615 y ATN-658, se muestran en la Figura 3. Ambos mAbs específicamente reconocen suPAR y, específicamente, el dominio D2D3 de uPAR.

35 [0214] La actividad funcional de los anticuerpos anti-D2D3 se evaluó en los ensayos de migración. Los experimentos precedentes han demostrado que las células CHO expresando uPAR migran hacia uPA en un ensayo de cámara de Boyden modificado (Figura 4) y que esta migración depende del GFD de uPA (no mostrado). Como se muestra en la Figura 4, la migración celular es inhibida por un mAb específico para D2D3 al igual que un Ab policlonal de conejo dirigido contra uPAR. De manera interesante, la migración celular también es inhibida por Abs de integrina anti-α5 pero no por Abs de integrina anti-α6. Tomando todos los datos, éstos sugieren que la integrina α5β1 y el uPAR son críticos para la migración inducida por uPA.

40 [0215] La utilidad de los diferentes Abs anti-D2D3 para la formación de imágenes o la dirección de diagnóstico de agentes terapéuticos depende de su capacidad para enlazar uPAR en la superficie celular con afinidad alta. Como se muestra en la Figura 5, Ab ATN-658 iodado se enlaza con células HeLa con un K<sub>D</sub> de aprox. 1,5 nM. Este es consistente con el K<sub>D</sub> para este determinado Ab en experimentos de unión directa (tabla 3), indicando que la unión no se ve afectada por el proceso de etiquetación.

45 [0216] uPA se puede unir al receptor de uPAR en la superficie del tumor o en células endoteliales *in vivo*. Así, los Abs que enlazan con uPAR en presencia de uPA, por lo tanto, tienen utilidad adicional como agentes de diagnóstico o de enfoque. El mAb ATN-658 no inhibe la unión de scuPA con uPAR (Figura 6) en la superficie de las células HeLa y es capaz de enlazar con células HeLa en presencia de scuPA. Así, ATN-658 pueden dirigirse tanto a receptores deshabilitados como ocupados en la superficie celular.

[0217] Las secuencias de aminoácidos de las cadenas de consenso  $V_L$  y  $V_H$ , incluyendo las tres regiones CDR de ANT-658 y ATN-615 se determinaron por métodos estándar y se han expuesto anteriormente, y por lo tanto no se repiten aquí, aunque deberían considerarse como incorporadas en esta descripción ejemplificadora.

## 5 EJEMPLO III

### Unión de uPA con uPAR

[0218] La unión de uPA con uPAR se midió usando  $^{125}\text{I}$ -etiquetado uPA y células HeLa. Las células HeLa expresan cantidades abundantes de uPAR pero no expresan uPA. Brevemente, 100  $\mu\text{g}$  de scuPA se marcó con 100  $\mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}$ Nal usando reactivo de yodación Iodo-Gen™ (Pierce Biotechnology Inc.). Nal marcado no incorporado se retiró de la proteína marcada utilizando una columna de exclusión de tamaño y la proteína marcada se eluyó en la solución salina tris-tamponada conteniendo 0,1% (BSA) de albúmina de suero bovino. Las células HeLa se incubaron con concentraciones en aumento de  $^{125}\text{I}$ -scuPA diluido en PBS conteniendo 0,1% BSA durante 2 h a 4°C. Las células se lavaron extensivamente con PBS/0 BSA, las monocapas celulares lisadas con 1M NaOH y el número total de cuentas enlazadas se determinaron. El enlace específico se determinó por incubación de células con  $^{125}\text{I}$ -scuPA en presencia de un gran exceso de scuPA no marcado. La unión se realizó también con células MDA-MB231 que expresan tanto uPA como uPAR. Para determinar la unión de scuPA, se retiró primero el uPA endógeno de la superficie de las células MDA-MB231 por lavado con un tampón conteniendo 0,1 M glicina/100 mM NaCl, pH 3 durante 5 minutos a 4°C. Este protocolo se usó también para determinar la unión de  $^{125}\text{I}$ -ATF con células HeLa. La capacidad de los Abs para inhibir la unión de  $^{125}\text{I}$ -scuPA o de  $^{125}\text{I}$ -ATF uniéndose con células HeLa se determinó por incubación de células con cantidades en aumento del Ab no marcado durante 15 minutos a 4°C, antes de la adición de la proteína  $^{125}\text{I}$ -etiquetada.

## 25 EJEMPLO IV

### Inhibición de la migración celular

[0219] La inhibición de la migración celular por Abs específicos para uPA o uPAR se evaluó usando un ensayo de cámara de Boyden modificado como descrito previamente (Tarui, T et al., (2003) J. Biol. Chem., 278:29863-29872)). Brevemente, el lado inferior de un filtro de cámara de Boyden se revistió con 500 nM uPA y tampón de migración libre de suero (medio de Eagle modificado por Dulbecco que contiene 10 mM HEPES y 0,5% albúmina de suero bovino) añadido a la cámara inferior. Células CHO de expresión de uPAR fueron resuspendidas en el tampón de migración libre de suero ( $8 \times 10^5$  células/ml) y 100  $\mu\text{l}$  se añadió a la cámara superior. Para probar la capacidad de los Abs anti-uPA o anti-uPAR para inhibir la migración celular, las células se preincubaron con 10  $\mu\text{g/ml}$  Ab durante 15 minutos antes de la adición a la cámara superior. Las células se incubaron luego a 37°C en 5%  $\text{CO}_2$  durante 20 h. Las células migrando a la cámara inferior fueron detectadas por coloración con 0,5% violeta cristal y microscopía óptica.

## EJEMPLO V

40 Ensayo para anticuerpos que reconoce el mismo epítipo que ATN-658 usando ATN-658 biotinilado

[0220] El Ab anti-D2D3, ATN-658, fue biotinilado utilizando EZ-link™ sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce Biotechnology Inc.) según las instrucciones del fabricante. Típicamente, un exceso molar 20 veces del reactivo de etiquetación de biotina se usó para marcar ATN-658 y biotina no incorporada se eliminó del Ab marcado usando una columna de tamaño de exclusión. Para asegurar que el Ab marcado retuvo su afinidad para uPAR, se evaluó Biotina-ATN-658 en un ensayo de ELISA para unión con suPAR. El Biotina-ATN-658 unido fue detectado utilizando estreptavidina conjugada con HRP. El etiquetado de biotina no redujo la afinidad de ATN-658 para suPAR (Figura 9). Para identificar Abs que reconocen el mismo epítipo que ATN-658 se estableció un ensayo de competición. Brevemente, placas de alta unión proteínica de EIA/RIA de 96 pocillos se revistieron con 100 ng/pocillo de suPAR durante toda la noche a 4°C. Después del bloqueo de la unión inespecífica con 1% caseína, se lavaron las placas con PBS y los Abs para evaluar, diluidos en PBS/0,1% de caseína conteniendo 0,2 nM de Biotina-ATN-658, añadido a los pocillos apropiados. Las placas fueron incubadas durante otra hora más a temperatura ambiente, lavadas extensivamente con PBS/0 Tween-20 y el Biotina-ATN-658 enlazado detectado utilizando estreptavidina conjugada con HRP y el sustrato apropiado (Figura 10A/10B).

## 55 EJEMPLO VI

### Actividades de mAbs *in vivo*

[0221] Se evaluaron anticuerpos para su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* en dos modelos: el modelo de cáncer pulmonar de humano de célula no pequeña A549y el modelo de cáncer ovárico A2780 utilizando los protocolos y las condiciones descritas en el ejemplo I. Se inició el tratamiento el día después de la inoculación del tumor. El Ab de control de IgG (y el control de PBS) al igual que el mAb ATN-658 de UPAR anti-D2D3 fue administrado por vía intraperitoneal en 10 mg/kg dos veces a la semana, los lunes y viernes.

65 [0222] El ATN-658 significativamente inhibió el crecimiento en ambos modelos (Figura 7 y 8).

[0223] En caso de desacuerdo entre las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente y las del listado de secuencia de papel adjunto o presentado más adelante, las secuencias precedentes primarán.

Listado de secuencias

- 5 [0224]
- <110> ATTENUON LLC
- 10 <120> Ligandos uniéndose al complejo del activador plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y su receptor (uPAR) que inhiben interacciones de uPAR aguas abajo: identificación y uso en el diagnóstico o terapia
- <130> 28932.0009
- 15 <140> PCT/US05/18322  
<141> 2005-05-25
- <150> US 60/573,896  
<151> 2004-05-25
- 20 <160> 16
- <170> Patente en la versión 3.2
- 25 <210> 1  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Desconocido
- 30 <220>  
<223> Secuencia de consenso
- <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISC  
35 <222> (3)..(3)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- <400> 1  
**Asp Ile Xaa Leu Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly**  
**1 . 5 10 15**  
**Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser**  
**.20 25 30**  
**Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser**  
**35 40 45**  
**Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro**  
**50 55 60**  
**Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile**  
**65 70 75 80**  
**Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly**  
**85 90 95**  
**Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys**  
**100 105 110**
- 40 **Leu**
- <210> 2  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Desconocido
- 45

<220>

<223> Secuencia de consenso

<400> 2

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr  
 20 25 30  
 Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45  
 Glu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Ile Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Arg Thr Ala Tyr Met  
 65 70 75 80  
 Gln Phe Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Ser Ile Tyr Gly His Ser Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Ser  
 115

5

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Desconocido

10

<220>

<223> Secuencia de consenso

15

<400> 3

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn  
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Desconocido

20

<220>

<223> Secuencia de consenso

25

<400> 4

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser  
 1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Desconocido

30

<220>

<223> Secuencia de consenso

35

<400> 5

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 6

<211> 10

40

<212> PRT  
 <213> Desconocido

<220>  
 5 <223> Secuencia de consenso

<400> 6  
**Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His**  
 1 5 10

<210> 7  
 10 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

<220>  
 15 <223> Secuencia de consenso

<400> 7  
**Glu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Ile Lys**  
 1 5 10 15

20 Gly

<210> 8  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 25 <213> Desconocido

<220>  
 <223> Secuencia de consenso

30 <400> 8  
**Ser Ile Tyr Gly His Ser Val Leu Asp Tyr**  
 1 5 10

<210> 9  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 35 <213> Desconocido

<220>  
 <223> Secuencia de consenso

40 <400> 9  
**Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ile Thr Ala Ala Ser Leu Gly**  
 1 5 10 15

**Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met**  
 20 25 30

**His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe**  
 35 40 45

**Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser**  
 50 55 60

**Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu**  
 65 70 75 80  
**Asp Ala Ala Ile Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Phe Thr Phe**  
 85 90 95

**Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg**  
 100 105

<210> 10  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

5

<220>  
 <223> Secuencia de consenso

<400> 10  
**Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala Ser**  
**1 5 10 15**

**Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe Tyr**  
**20 25 30**

**Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly**  
**35 40 45**

**Trp Ile Phe His Gly Ser Asp Asn Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys**  
**50 55 60**

**Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met**  
**65 70 75 80**

**Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala**  
**85 90 95**

**Arg Trp Gly Pro His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr**  
**100 105 110**

**Val Thr Val Ser Ser**  
**115**

10

<210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

15

<220>  
 <223> Secuencia de consenso

**Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His**  
 <400> 11 **1 5 10**

20

<210> 12  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

25

<220>  
 <223> Secuencia de consenso

<400> 12  
**Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser**  
**1 3**

30

<210> 13  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

35

<220>  
 <223> Secuencia de consenso

<400> 13

40

**Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Phe Thr**  
**1 5**  
 <210> 14  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 5 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 10 <400> 14  
**Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe Tyr Ile His**  
**1 5 10**  
 <210> 15  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 15 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 20 <400> 15  
**Trp Ile Phe His Gly Ser Asp Asn Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys**  
**1 5 10 15**  
**Asp**  
 <210> 16  
 <211> 9  
 25 <212> PRT  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 30 <400> 16  
**Trp Gly Pro His Trp Tyr Phe Asp Val**  
**1 5**  
 LISTADO DE SECUENCIAS  
 35 [0225]  
 <110> ATTENUON LLC  
 40 <120> Ligandos uniéndose al complejo de activador plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y su receptor (uPAR) que  
 inhiben interacciones de uPAR aguas abajo: identificación y uso en el diagnóstico o terapia  
 <130> P6012748PCT/EP  
 45 <140> PCT/US04/018322  
 <141> 2005-05-25  
 <150> US 60/573,896  
 <151> 2004-05-25  
 50 <160> 16  
 <170> Versión de patentIn 3.2  
 55 <210> 1  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

ES 2 398 221 T3

<220>

<223> Secuencia de consenso

<220>

5 <221> CARACTERÍSTICA MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 1

10

Asp Ile Xaa Leu Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95  
Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

**Leu**

<210> 2

15 <211> 117

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

20 <223> Secuencia de consenso

<400> 2

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr  
 20 25 30

Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45

Glu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Ile Lys  
 50 55 60

Gly Arg Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Arg Thr Ala Tyr Met  
 65 70 75 80

Gln Phe Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg Ser Ile Tyr Gly His Ser Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser  
 115

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Secuencia de consenso

10 <400> 3

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn  
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 7

15 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Secuencia de consenso

20 <400> 4

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser  
 1 5

<210> 5

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Secuencia de consenso



ES 2 398 221 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ile Thr Ala Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe  
35 40 45

Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Phe Thr Phe  
85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 10

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Secuencia de consenso

10 <400> 10

Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe Tyr  
 20 25 30

Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45

Trp Ile Phe His Gly Ser Asp Asn Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 50 55 60

Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met  
 65 70 75 80

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
 85 90 95

Arg Trp Gly Pro His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Secuencia de consenso

10 <400> 11

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His  
 1 5 10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Desconocido

<220>

<223> Secuencia de consenso

20 <400> 12

Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Desconocido

<220>

<223> Secuencia de consenso

<400> 13  
**Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Phe Thr**  
 1 5  
 <210> 14  
 <211> 10  
 5 <212> PRT  
 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 10  
 <400> 14  
**Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe Tyr Ile His**  
 1 5 10  
 <210> 15  
 <211> 17  
 15 <212> PRT  
 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 20  
 <400> 15  
**Trp Ile Phe His Gly Ser Asp Asn Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys**  
 1 5 10 15  
 25 Asp  
 <210> 16  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido  
 30  
 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
  
 <400> 16  
**Trp Gly Pro His Trp Tyr Phe Asp Val**  
 1 5  
 35

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo, que incluye:
  - 5 (a) una cadena  $V_L$  que comprende tres CDRs que tienen las secuencias de aminoácidos respectivas SEQ ID n°: 3, SEQ ID n°: 4 y SEQ ID n°: 5 y
  - (b) una cadena  $V_H$  que comprende tres CDRs que tienen las secuencias de aminoácidos respectivas SEQ ID n°: 6, SEQ ID n°: 7 y SEQ ID n°: 8;

10 donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo tiene la propiedad de unirse con uPAR
2. Anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo tiene la propiedad de unirse con uPAR sin inhibición de la unión de uPA.
- 15 3. Anticuerpo monoclonal purificado o fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende una cadena  $V_L$  que tiene la secuencia SEQ ID n°: 1 y una cadena  $V_H$  que tiene la secuencia SEQ ID n°: 2.
- 20 4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que está
  - (a) marcado de manera diagnósticamente detectable, o
  - (b) marcado, conjugado o fusionado con una fracción terapéuticamente activa, que hace a dicho anticuerpo terapéuticamente activo.

25
5. Composición de diagnóstico que incluye:
  - (a) el anticuerpo marcado según la reivindicación 4(a); y
  - (b) un portador diagnósticamente aceptable.

30
6. Composición según la reivindicación 5 donde el anticuerpo se marca con un radionucleido, un agente imprimible en PET, un agente imprimible en MRI, un agente fluorescente, un fluorógeno, un cromóforo, un cromógeno, un fosforizador, un quimioluminisador o un bioluminisador.
- 35 7. Composición según la reivindicación 6, donde el marcador es un radionucleido seleccionado del grupo que consiste en  $^3H$ ,  $^{14}C$ ,  $^{35}S$ ,  $^{67}Ga$ ,  $^{68}Ga$ ,  $^{22}As$ ,  $^{89}Zr$ ,  $^{97}Ru$ ,  $^{99}TC$ ,  $^{111}In$ ,  $^{123}I$ ,  $^{125}I$ ,  $^{131}I$ ,  $^{169}Yb$  y  $^{201}Tl$ .
- 40 8. Composición según la reivindicación 6 donde el marcador es un agente fluorescente o fluorógeno seleccionado del grupo que consiste en fluoresceína, rodamina, dansilo, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído, fluorescamina, un derivado de fluoresceína, verde de Oregón, verde de rodamina, verde de rodol y rojo de Texas.
- 45 9. Composición farmacéutica terapéutica antiangiogénica o anti-tumoral que incluye:
  - (a) una cantidad eficaz del anticuerpo terapéuticamente activo según la reivindicación 4(b); y
  - (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

50
10. Composición farmacéutica terapéutica según la reivindicación 9 en una forma adecuada para la inyección.
11. Composición farmacéutica terapéutica según la reivindicación 9 donde la fracción terapéuticamente activa se conjuga directamente o se enlaza indirectamente con el anticuerpo.
- 55 12. Composición farmacéutica terapéutica según la reivindicación 9 donde la fracción terapéuticamente activa es un fármaco quimioterapéutico, una toxina o un radionucleido terapéutico.
13. Composición farmacéutica terapéutica según la reivindicación 9 donde una fracción terapéuticamente activa es un péptido o polipéptido, tal como una toxina, fusionada con dicho anticuerpo.
- 60 14. Anticuerpo terapéuticamente activo según la reivindicación 4(b) para su uso como medicamento.
15. Anticuerpo terapéuticamente activo según la reivindicación 4 (b) para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o condición **caracterizada por** angiogénesis indeseada, crecimiento tumoral y/o metástasis tumoral.

65

16. Uso de un anticuerpo terapéuticamente activo según la reivindicación 4(b) para la producción de un medicamento para su uso en el tratamiento de un sujeto con una enfermedad, trastorno o condición **caracterizada por** angiogénesis indeseada, crecimiento tumoral y/o metástasis tumoral.
- 5 17. Anticuerpo terapéuticamente activo para su uso según la reivindicación 14 o 15 o un uso según la reivindicación 16, donde la fracción terapéuticamente activa se conjuga directamente o se enlaza indirectamente con el anticuerpo.
18. Anticuerpo terapéuticamente activo para su uso o un uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 - 17, donde la fracción terapéuticamente activa es un fármaco quimioterapéutico, una toxina o un radionucleido terapéutico.
- 10 19. Anticuerpo terapéuticamente activo para su uso o un uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 - 18, donde la fracción terapéuticamente activa es un péptido o polipéptido, tal como una toxina, fusionada con dicho anticuerpo.
- 15 20. Método *in vitro* para inhibir la migración celular, invasión celular, proliferación celular o angiogénesis, o para inducir apoptosis, incluyendo la puesta en contacto de células asociadas a la migración, invasión, proliferación o angiogénesis celular indeseada con una cantidad eficaz de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 o 4 (b).

**Fig. 1**

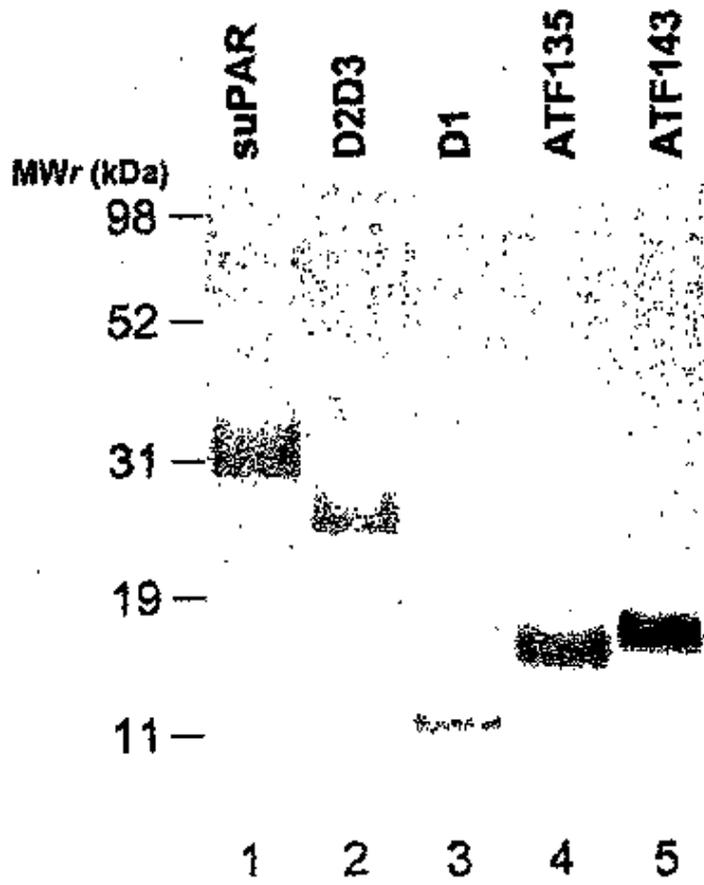
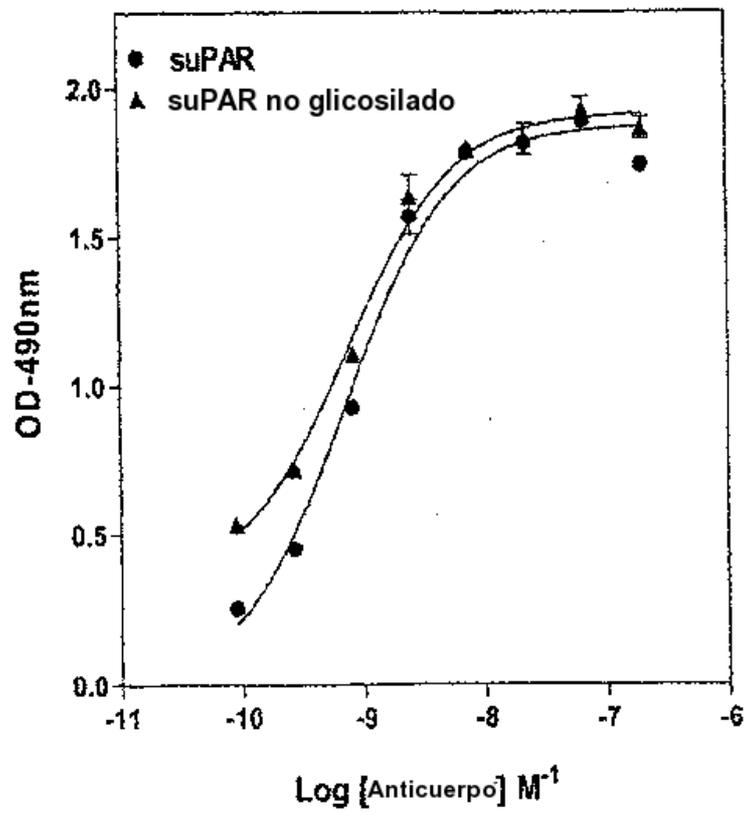
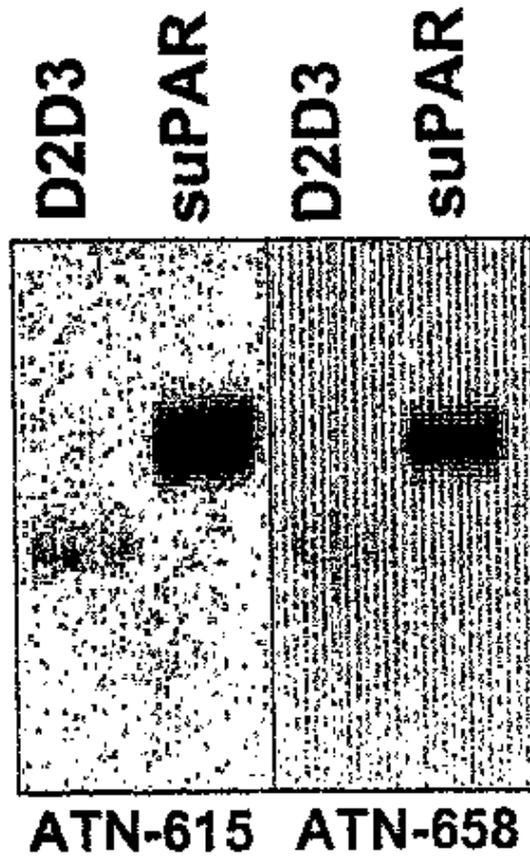


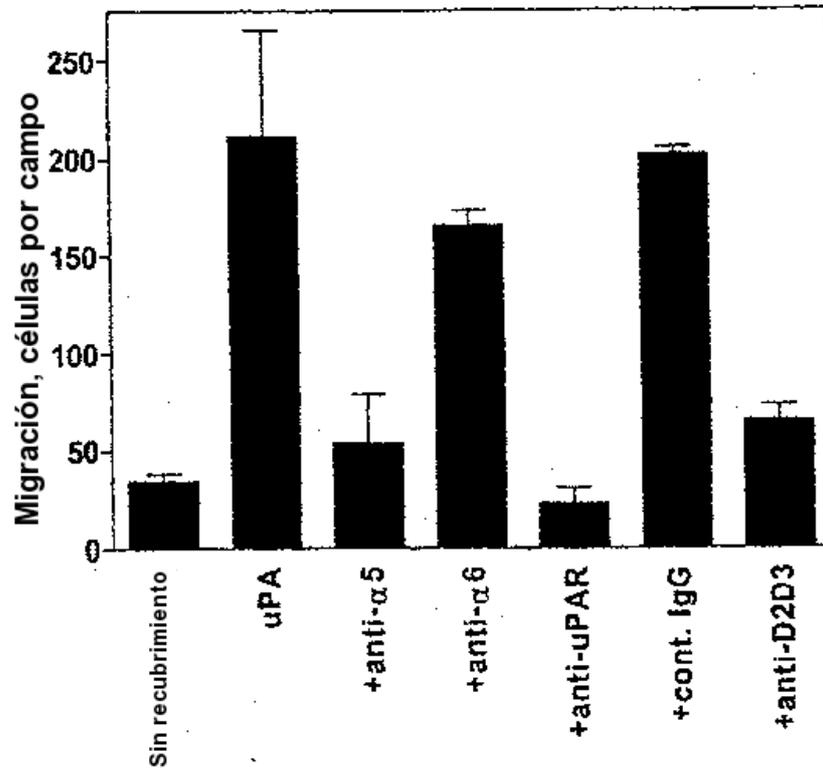
Fig. 2



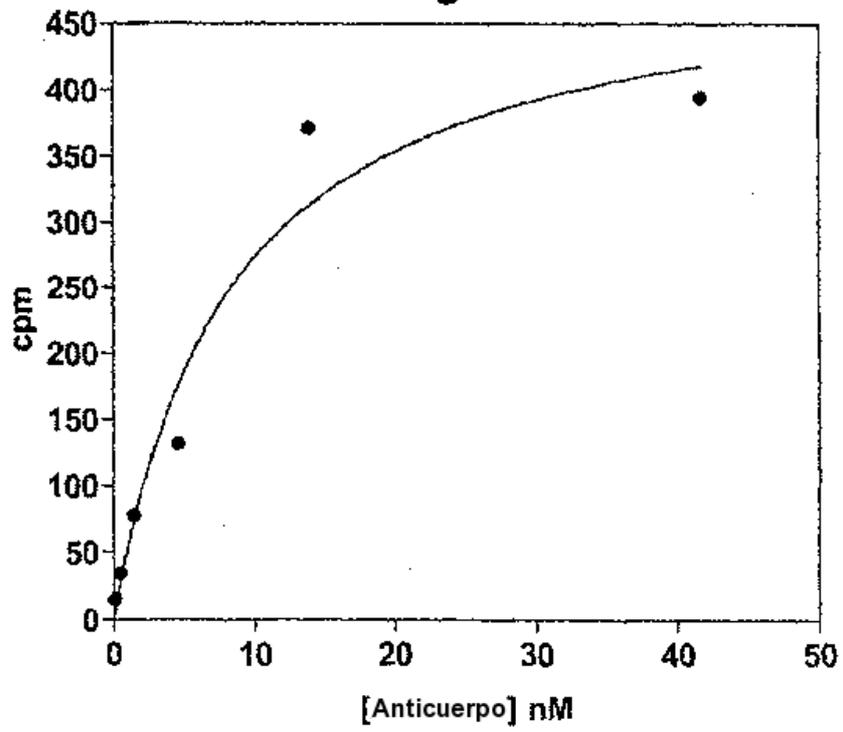
**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**

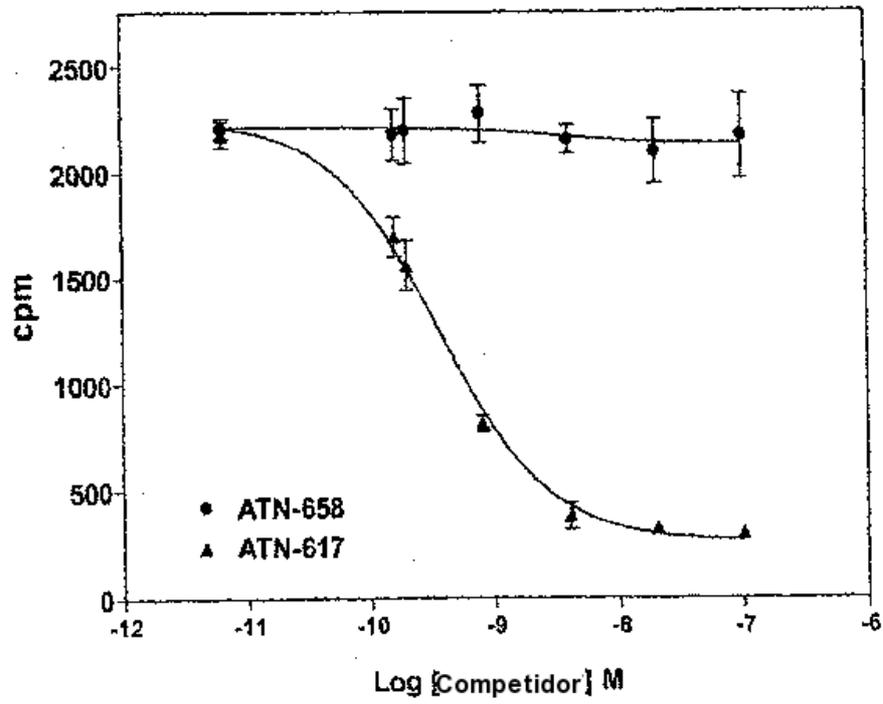


Fig. 7

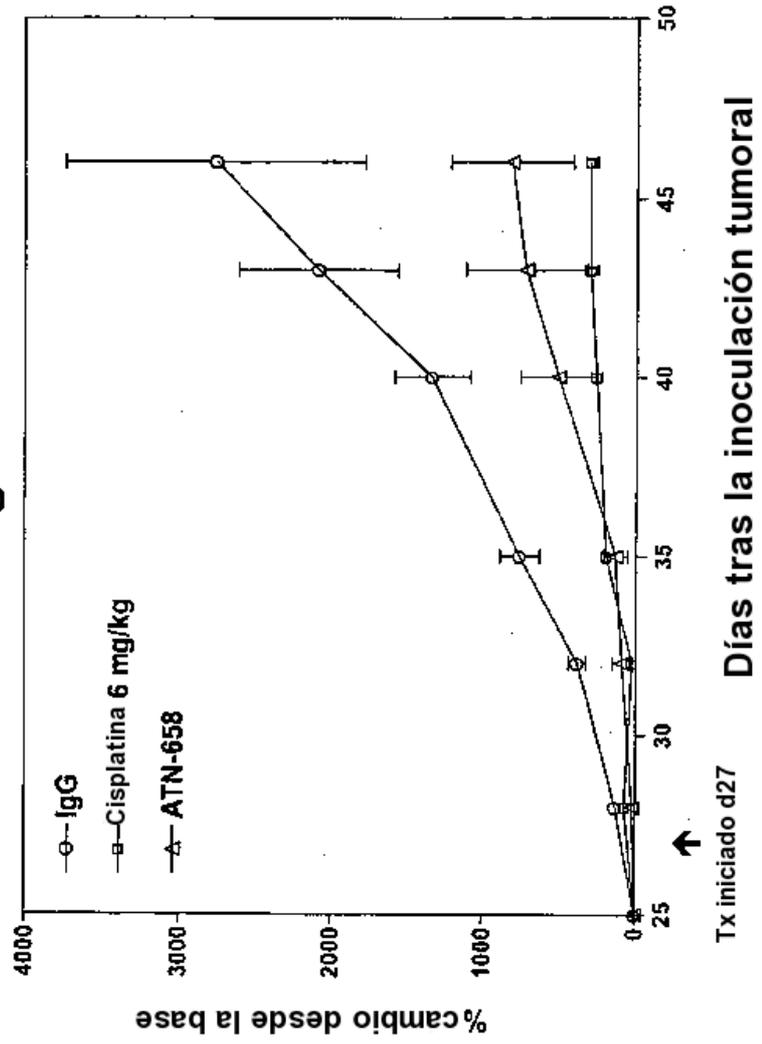


Fig. 8

