(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 524 325**

(51) Int. CI.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2003 E 10184072 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2269656**

(54) Título: **Anticuerpos seleccionados que se unen a aminofosfolípidos y su uso en el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

15.07.2002 US 396263 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2014

(73) Titular/es:

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
201 West 7th Street
Austin, TX 78701, US

(72) Inventor/es:

THORPE, PHILIP, E.;
RAN, SOPHIA y
HUANG, XIANMING

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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 seleccionados que se unen a aminofosfolípidos y su uso en el tratamiento del cáncer

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a los campos de la biología de los aminofosfolípidos y de los fosfolípidos aniónicos y de vasos sanguíneos tumorales. Sorprendentemente proporciona nuevas composiciones, y sus usos y combinaciones que se dirigen a la vasculatura tumoral y al tratamiento del cáncer. La invención proporciona además diversas composiciones de anticuerpos e inmunoconjugados que se unen e inhiben a aminofosfolípidos y a fosfolípidos aniónicos para su uso en el tratamiento del cáncer y enfermedades relacionadas.

2.- Descripción de la técnica relacionada

La resistencia de las células de tumores a los agentes quimioterapéuticos representa un problema significativo en la oncología clínica. Otro problema principal que hay que abordar en el tratamiento de tumores, es el deseo de lograr una "destrucción total de las células", es decir, destruir todas las células neoplásicas conocidas como "clonogénicas" que tienen la capacidad de crecer de manera incontrolada y reemplazar cualquier masa tumoral que pueda eliminarse mediante la terapia. A pesar de determinados avances en el campo, existen dos razones principales por las cuales muchas formas frecuentes de cáncer humano resisten aún la intervención quimioterapéutica eficaz.

Debido al objetivo de desarrollar tratamientos que se enfoquen a una destrucción total de las células, determinados tipos de tumores han sido más susceptibles a la terapia que otros. Por ejemplo, los tumores de tejidos blandos, por ejemplo, linfomas y tumores de la sangre y órganos formadores de sangre, por ejemplo, leucemias, han sido generalmente más sensibles a la terapia quimioterapéutica que los tumores sólidos, tales como los carcinomas.

Una razón de la susceptibilidad de los tumores blandos y los tumores basados en sangre, a la quimioterapia, es la mayor facilidad de acceso del linfoma y de las células leucémicas, a la intervención quimioterapéutica. En pocas palabras, es mucho más difícil que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos lleguen a todas las células de una masa de tumor sólido que a los tumores blandos y a los tumores basados en sangre, y por lo tanto es mucho más difícil lograr una destrucción total de las células. El aumento de la dosis de los agentes quimioterapéuticos produce más frecuentemente efectos secundarios tóxicos, lo que limita generalmente la eficacia de los agentes antitumorales convencionales.

Otra estrategia para el tratamiento de tumores es el uso de una "inmunotoxina", en la que se usa un anticuerpo de células antitumorales, para suministrar una toxina a las células tumorales. Sin embargo, en común con los enfoques quimioterapéuticos, la terapia con inmunotoxinas también tiene desventajas significativas cuando se aplica a tumores sólidos. Por ejemplo, células negativas a antígenos o deficientes de antígenos pueden sobrevivir y volver a poblar el tumor o conducir a metástasis adicionales. Una razón adicional de la resistencia de los tumores sólidos a las terapias basadas en anticuerpos, es que la masa tumoral es generalmente impermeable a agentes macromoleculares tales como anticuerpos e inmunotoxinas. Tanto las distancias para la difusión física como la presión intersticial, dentro del tumor, son limitaciones significativas a este tipo de terapia.

Una estrategia de tratamiento mejorada es dirigirse a la vasculatura de los tumores sólidos. El direccionamiento a los vasos sanguíneos de los tumores, en vez de a las propias células tumorales, tiene determinadas ventajas porque es improbable que conduzca al desarrollo de células tumorales resistentes, y porque las células diana son fácilmente accesibles. Además, la destrucción de los vasos sanguíneos conduce a una amplificación del efecto antitumoral, ya que muchas células tumorales dependen de un solo vaso para obtener su oxígeno y nutrientes. En las patentes de Estados Unidos Nos 5,855,866, 5,965,132, 6,261,535, 6,051,230 y 6,451,312 se describen agentes de direccionamiento vascular (ADV) ejemplares, que describen el suministro dirigido de agentes anticelulares y toxinas a marcadores de vasculatura tumoral.

Otra versión eficaz del enfoque de direccionamiento vascular es dirigirse a un factor de coagulación en un marcador expresado o adsorbido dentro de la vasculatura tumoral o estroma (Huang *et al.*, 1997; patentes de Estados Unidos Nos 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289 y 6.036.955). El suministro de coagulantes, en vez de toxinas, a la vasculatura tumoral, tiene las ventajas adicionales de una inmunogenicidad reducida e incluso menores riesgos de efectos secundaros tóxicos. Como se describe en la patente de Estados Unidos 5.877.289, un factor de coagulación preferido para su uso en dichos "coaguligandos" específicos de tumor, es una versión truncada de la proteína humana inductora de la coagulación, el Factor Tisular (TF), el principal iniciador de la coagulación sanguínea.

Recientemente se identificaron los aminofosfolípidos fosfatidilserina (FS) y fosfatidiletanolamina (FE) como marcadores específicos de vasculatura tumoral (Ran *et al.*, 1998). Esto condujo al desarrollo de nuevos inmunoconjugados anti-FS y anti-FE para suministrar agentes anticelulares, toxinas y factores de coagulación, a los vasos sanguíneos tumorales (patente de Estados Unidos Nº 6.312.694). Además se descubrió que anticuerpos no

conjugados con FS y FE ejercían un efecto anticanceroso sin conexión con un agente terapéutico, lo que llegó a conocerse como el enfoque de "anticuerpo desnudo" aminofosfolipídico para el tratamiento y direccionamiento vascular tumoral (patente de Estados Unidos Nº 6.406.693).

Aunque los métodos anteriores de direccionamiento vascular aminofosfolipídico y con inmunoconjugados representan avances significativos en el tratamiento de tumores, ciertas células tumorales periféricas pueden sobrevivir a la destrucción generalizada del tumor causada por dichas terapias. Se contemplan por tanto estrategias antiangiogénicas, que inhiban el desarrollo de nueva vasculatura de vasos sanguíneos preexistentes y/o de células madre endoteliales circulantes, para su uso en combinación con los métodos de ADV, de direccionamiento con coaguligandos y aminofosfolípidos de las patentes de Estados Unidos Nos 5.855.866, 6.093.399, 6.312.694 y 6.406.693.

La angiogénesis juega un papel importante en procesos fisiológicos, tales como embriogénesis, cicatrización de heridas y menstruación, pero también está implicada en determinados sucesos patológicos, tales como, el crecimiento de tumores, artritis, psoriasis y retinopatía diabética (Ferrara, 1995). Como se aplican al tratamiento de tumores, las estrategias antiangiogénicas se basan en inhibir la proliferación de vasos germinales, generalmente en la periferia de un tumor sólido. Estas terapias se aplican principalmente para reducir el riesgo de micrometástasis o para inhibir el crecimiento adicional de un tumor sólido después de una intervención más convencional (tal como cirugía o quimioterapia).

Las patentes de Estados Unidos Nos 6.342.219, 6.524.583, 6.342.221 y 6.416.758 describen anticuerpos e inmunoconjugados que se unen al factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF, anteriormente conocido como factor de permeabilidad vascular, FPV), un estimulante primario de la angiogénesis. Estos anticuerpos tienen la ventaja importante de inhibir la unión del VEGF únicamente a uno de los dos receptores primarios del VEGF. Bloqueando la unión del VEGF al VEGFR2, pero no al VEGFR1, estos anticuerpos tienen un perfil de seguridad mejorado, manteniendo efectos beneficiosos mediados por el VEGFR1, por ejemplo, en las funciones de macrófagos, osteoclastos y condroclastos.

Rudikoff et al., Proc. Natl. Acad Sci., USA, 79:1979-1983, 1982, se refieren a una sustitución de aminoácido en la proteína de mieloma de unión a PCho, S107, que altera la especificidad de unión antigénica.

MacCallum et al., J. Mol. Biol., Biol., 262:732-745, 1996, se refieren a análisis de contacto y a la topografía y clasificación de sitos de unión en determinadas interacciones ente el antígeno y el anticuerpo.

De Pascalis et al., J. Immunol., 169:3076-3084, 2002 comunican que solo un tercio de los restos CDR están implicados en la interacción con el antígeno y se refieren a regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con injerto simplificado para modificar con ingeniería genética anticuerpos monoclonales humanizados inmunogénicos.

Wu et al., J. Mol. Biol., 294:151-162, 1999, se refieren a la humanización de un anticuerpo monoclonal murino contra CD40 por la optimización simultánea de restos de regiones marco conservadas y CDR usando bibliotecas CDR con mutaciones al azar en la tercera CDR de las cadenas pesada y ligera.

El documento US 6.406.693 desvela determinadas composiciones y métodos basados en anticuerpos anti-aminofosfolípidos para su uso en el tratamiento de tumores.

Aunque los métodos anteriores han avanzado en la técnica del tratamiento de tumores, todavía se busca el desarrollo de terapias alternativas o adicionales dirigidas a la vasculatura. La identificación de nuevos marcadores de la vasculatura tumoral es necesaria para ampliar el número de opciones terapéuticas. El desarrollo de nuevos anticuerpos desnudos con propiedades anticancerosas, sería un avance particularmente importante ya que esto permitiría usar la misma porción de direccionamiento tanto como un producto terapéutico de un solo agente y como un agente de direccionamiento vascular para el suministro de otros fármacos. Los agentes terapéuticos que tengan propiedades tanto antiangiogénicas como antivasculares, es decir, propiedades destructoras de tumores, dentro de la misma molécula, serían de gran valor. Un avance incluso más importante sería la identificación de una clase de agentes terapéuticos con propiedades anticancerosas y efectos terapéuticos en otros sistemas. El desarrollo de agentes capaces de tratar tanto el cáncer como las infecciones virales, dos de los desafíos médicos más significativos de esta era, sería una revelación notable e importante.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición como se expone en las reivindicaciones.

La presente invención aborda las necesidades anteriores así como otras de la técnica anterior, al proporcionar composiciones para el direccionamiento seguro y eficaz a la vasculatura tumoral, la antiangiogénesis y la destrucción tumoral, cuyos métodos y composiciones son también sorprendentemente eficaces para inhibir la entrada y diseminación viral y para el tratamiento de infecciones y enfermedades virales. La invención se basa, en parte, en descubrimientos sorprendentes, concernientes a la expresión y papel que desempeñan los fosfolípidos aniónicos en la

vasculatura tumoral y la implicación de los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos en la entrada y diseminación viral. La presente invención proporciona además anticuerpos e inmunoconjugados particularmente ventajosos, que se unen a aminofosfolípidos y a fosfolípidos aniónicos, y a una nueva clase de derivados basados en péptidos que se unen a la fosfatidiletanolamina.

Observación: las materias objeto que no quedan incluidas en el ámbito de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

Revisión general: En una primera realización global, la invención proporciona nuevos métodos para dirigirse a la vasculatura tumoral, la formación de imágenes y el tratamiento en base al descubrimiento inesperado de que los fosfolípidos aniónicos, tales como el fosfatidilinositol (FI), el ácido fosfatídico (AF) y el fosfatidilglicerol (FG), (así como la fosfatidilserina, FS), son marcadores accesibles y estables que pueden dirigirse a la vasculatura tumoral. Esta realización surgió del descubrimiento inesperado de que los anticuerpos contra el AF, el FI y el FG, y contra otros componentes fosfolipídicos aniónicos, se localizan específicamente en la vasculatura de tumores sólidos.

Se desarrollaron aspectos adicionales en esta realización a partir del descubrimiento inesperado de que los anticuerpos desnudos contra fosfolípidos aniónicos, tales como el AF, el FI, y el FG (así como la FS), inhiben específicamente la angiogénesis de los vasos sanguíneos tumorales e inducen la destrucción de la vasculatura tumoral y la necrosis tumoral *in vivo* sin conjugación con moléculas efectoras, tales como toxinas o coagulantes. Por tanto la invención proporciona métodos seguros y eficaces para el direccionamiento vascular, la antiangiogénesis y el tratamiento de tumores usando productos terapéuticos basados en anticuerpos de un solo componente, que se unen a fosfolípidos aniónicos.

Una característica sorprendente fundamental de la invención es que la translocación de fosfolípidos aniónicos en la superficie de las células endoteliales vasculares tumorales ocurre, al menos en una parte significativa, en forma independiente del daño celular y de los mecanismos apoptóticos u otros mecanismos de muerte celular. La expresión de los fosfolípidos aniónicos en la vasculatura tumoral no es por tanto una consecuencia de, o un desencadenante de, muerte y destrucción celular, sino que ocurre en células endoteliales vasculares morfológicamente intactas. Esto significa que la expresión de fosfolípidos aniónicos en la vasculatura tumoral no es transitoria, sino que más bien es lo suficientemente estable para proporcionar una diana para la intervención terapéutica.

Dado el descubrimiento de que los fosfolípidos aniónicos se inducen de manera estable en la vasculatura tumoral, la invención proporciona además una variedad de nuevos métodos y composiciones para formar imágenes de la vasculatura tumoral y para su destrucción, usando inmunoconjugados de anticuerpos contra fosfolípidos aniónicos. Estos inmunoconjugados comprenden anticuerpos contra fosfolípidos aniónicos que se encuentran conectados operativamente a agentes terapéuticos, tales como toxinas y coagulantes, y son útiles en el suministro específico de productos de diagnóstico y productos terapéuticos a la superficie de las membranas celulares endoteliales de la vasculatura tumoral. Los agentes terapéuticos se suministran en contacto íntimo con la membrana celular endotelial de la vasculatura tumoral, permitiendo ya sea una rápida entrada en la célula diana o una asociación rápida con células efectoras, componentes de la cascada de coagulación, y similares.

En una segunda realización global, la invención proporciona diversos anticuerpos preferidos que se unen a aminofosfolípidos y a fosfolípidos aniónicos (e inmunoconjugados y composiciones relacionadas), cuyos anticuerpos tienen estructuras y propiedades que proporcionan ventajas con respecto a los conocidos en la técnica. Estos anticuerpos denominados como de "segunda generación" o anticuerpos mejorados, se usarán preferentemente en los métodos de tratamiento antiangiogénicos, anticancerosos y antivirales, así como en otros métodos de tratamiento, descritos en el presente documento.

Las nuevas clases de anticuerpos que se unen a aminofosfolípidos y a fosfolípidos aniónicos proporcionados por la presente invención, superan varias desventajas en la técnica anterior, al proporcionar anticuerpos terapéuticos sin las propiedades patógenas normalmente asociadas con anticuerpos contra aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos en la técnica. La invención se desarrolló, en parte, usando nuevas técnicas de inmunización y selección desarrolladas a partir de observaciones únicas de los inventores sobre el comportamiento de los fosfolípidos en células endoteliales vasculares tumorales, y distanciando los anticuerpos generados de los anticuerpos anti-fosfolípidos asociados con la enfermedad. Esos anticuerpos no solamente tienen propiedades únicas y una seguridad mejorada, sino que son igualmente o más eficaces que los anticuerpos existentes, en estudios comparativos. Las composiciones y métodos de esos aspectos de la invención se amplían también al uso de inmunoconjugados y combinaciones, usando la categoría específica de anticuerpos proporcionada.

Antes de la presente invención, los anticuerpos que se unen a aminofosfolípidos y a fosfolípidos aniónicos y que tienen las propiedades de los nuevos anticuerpos descritos en este documento, no se conocían. Sin embargo, a la luz de la invención descrita en este documento, se dota ahora a la técnica de la metodología para generar nuevos anticuerpos candidatos y, con las técnicas para ensayar esos anticuerpos, identificar anticuerpos útiles adicionales a partir del grupo de candidatos. Por lo tanto, a la luz de esta invención, se puede producir una variedad de anticuerpos con propiedades ventajosas y con perfiles de unión aminofosfolipídicos y fosfolipídicos aniónicos, que no tengan las notables desventajas y efectos secundarios asociados con los anticuerpos de la técnica anterior. Dichos anticuerpos

pueden por tanto usarse en una variedad de realizaciones, incluyendo la inhibición de la angiogénesis y el tratamiento del cáncer e infecciones virales.

Además de las nuevas técnicas de inmunización y selección proporcionadas en el presente documento, anticuerpos que se unen a aminofosfolípidos y a fosfolípidos aniónicos, y que tienen diversas propiedades ventajosas, pueden identificarse ahora mediante ensayos de competencia y/o funcionales, usando los anticuerpos monoclonales 1B9, 1B12, 3B10, 2G7, 7C5, 9D2 o 3G4. Actualmente se prefieren más los anticuerpos monoclonales 9D2 y 3G4, y estos anticuerpos no requieren de suero para la unión al fosfolípido. Los anticuerpos monoclonales 9D2 y 3G4 son los más preferidos, siendo el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC 4545) actualmente el más preferido. Para identificar anticuerpos adicionales que compitan con cualquiera de los anticuerpos anteriores, preferentemente el 3G4, los ensayos preferidos son actualmente ensayos de competencia basados en un ELISA, de los cuales se describen algunos en el presente documento así como ejemplos de trabajo con los mismos.

En una tercera realización global, la invención proporciona una nueva clase de derivados basados en péptidos impermeables a la célula, que se unen al aminofosfolípido fosfatidiletanolamina (FE). Estos "derivados de péptidos que se unen a FE" comprenden al menos un primer péptido que se une a FE, preferentemente duramicina, que se ha modificado para prevenir sustancialmente la toxicidad no específica, preferentemente modificando el péptido que se une a FE, preferentemente duramicina, para formar una construcción de unión a FE sustancialmente impermeable a la célula o que sustancialmente no forme poros.

La generación de una construcción de unión a FE o duramicina "sustancialmente impermeable a la célula", se consigue preferentemente poniendo en contacto el péptido de unión a FE o duramicina con al menos a un primer grupo impermeable a la célula. En el presente documento se describe la síntesis de diversos derivados de duramicina ejemplares. El "grupo o grupos impermeables a las célula" pueden ser moléculas pequeñas, transportadores inertes, o pueden ser en sí mismos agentes de direccionamiento que confieren una función de direccionamiento adicional a la construcción resultante, tal como el direccionamiento a la vasculatura tumoral. De esta manera el péptido de unión a FE puede ser el único agente de direccionamiento unido a un transportador inerte, o puede ser uno de dos agentes cada uno de los cuales confiere una función de direccionamiento a la construcción. Adicionalmente, los péptidos de unión a FE, preferentemente duramicina, están conectados operativamente con efectores, de tal manera que el péptido de unión a FE o duramicina proporciona la función de direccionamiento, y el agente conectado tiene un efecto terapéutico sustancial, una vez suministrado a la célula diana. Son ejemplos preferidos péptidos de unión a FE o duramicina unidos a agentes antivirales, tales como nucleósidos.

Como la FE está esencialmente ausente de la superficie de las células normales en condiciones normales, los péptidos de unión a FE, sustancialmente impermeables a la célula, de la presente invención, funcionan para unirse selectivamente a la FE en la superficie de células aberrantes o células asociadas con enfermedades, tales como células endoteliales vasculares tumorales, células proliferativas y/o viralmente infectadas. Al unirse a dichas células diana aberrantes, las construcciones o derivados de unión a la FE inhiben o interrumpen las funciones de la FE en esas células, produciendo entonces un beneficio terapéutico global, por ejemplo, en el tratamiento de tumores y/o enfermedades virales. En el presente documento se describe el uso satisfactorio de péptidos de unión a la FE, sustancialmente impermeables a las células, en la inhibición de la entrada y diseminación viral. En realizaciones donde los péptidos de unión a FE están conectados con agentes antivirales, tales como cidofovir, se proporciona un tratamiento antiviral mejorado y más seguro.

En una cuarta realización global, la invención proporciona además una nueva clase importante de composiciones y métodos para inhibir la replicación, infección y diseminación viral, para su uso en el tratamiento de infecciones y enfermedades virales. Estos métodos se basan en la idea sorprendente de que los anticuerpos y los péptidos que se unen a aminofosfolípidos y a fosfolípidos aniónicos, tales como FS, FE, FI, AF y FG, particularmente FS y PE, serían agentes antivirales seguros y eficaces. Esta idea no sólo ha demostrado ser correcta, sino que la presente invención proporciona datos que muestran el uso, inesperadamente eficaz, de anticuerpos y péptidos que se unen a aminofosfolípidos y a fosfolípidos aniónicos, para combatir la diseminación viral, lo que significa que estos agentes pueden aplicarse ampliamente en el tratamiento de una variedad de infecciones virales y enfermedades asociadas.

Estos descubrimientos comprenden además nuevas categorías de inmunoconjugados, composiciones, kits y métodos de uso en los que un anticuerpo contra un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, particularmente FS y FE, se une operativamente a un agente antiviral. Los derivados de péptidos de unión a FE, sustancialmente impermeables a la célula, tales como los derivados peptídicos de duramicina, pueden unirse también a agentes antivirales. Cada uno de estos agentes proporciona entonces nuevos fármacos antivirales dirigidos exclusivamente a las células viralmente infectadas.

El desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, seguros, eficaces, en el tratamiento de la angiogénesis aberrante, el cáncer e infecciones virales, es entonces una revelación en la técnica.

Aunque exclusivamente eficaces, los diferentes métodos y composiciones de la invención pueden usarse también para favorecer, en combinación con otras terapias y agentes, el proporcionar métodos de tratamiento combinados, y composiciones relacionadas, productos farmacéuticos y kits de la invención. Por lo tanto, en una quinta realización

global, la invención proporciona además composiciones combinadas particulares, métodos y kits, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, que se han seleccionado y descubierto para funcionar sorprendentemente bien de manera conjunta, como se explica con mayor detalle en el presente documento.

Anticuerpos de segunda generación: En el Ejemplo IV e incorporados en las reivindicaciones en trámite se describen determinados métodos descubiertos que funcionan bien en la generación de anticuerpos con las propiedades deseadas. Estos métodos permitieron la generación de los anticuerpos ventajosos de la invención, tal como se ilustra mediante los anticuerpos monoclonales 1B9, 1B12, 3B10, 2G7, 7C5, 9D2 y 3G4, particularmente el 3G4 (ATCC 4545).

Por tanto, la invención proporciona anticuerpos purificados, fragmentos de unión al antígeno e inmunoconjugados de los mismos, que se unen a al menos un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS, y que compiten eficazmente con el anticuerpo monoclonal 1B9, 1B12, 3B10, 2G7, 7C5, 9D2 y 3G4, preferentemente con el 9D2 o 3G4 (ATCC 4545), y más preferentemente con 3G4, por la unión con el aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS.

Como se usa en toda la solicitud, los términos "un", "una", "unos" y "unas", se usan en el sentido que significa "al menos uno(a)", "al menos un(a) primer(a)", "uno(a) o más" o "una pluralidad" de los componentes o etapas a los que se hace referencia, excepto en casos en donde se establezca posteriormente en forma específica un límite superior. Por lo tanto, un "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, significa "al menos un primer anticuerpo". Los límites y parámetros de combinaciones, funcionales, al igual que las cantidades de cualquier agente individual, serán conocidos por los expertos habituales en la técnica a la luz de la presente descripción.

En ciertos aspectos, los anticuerpos competirán eficazmente con el anticuerpo monoclonal 1B9, 1B12, 3B10, 2G7, 7C5, 9D2 y 3G4, preferentemente con 9D2 o 3G4 y, más preferentemente con 3G4 (ATCC 4545), por la unión con un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS, o tendrán el perfil de unión aminofosfolipídico o fosfolipídico aniónico del anticuerpo monoclonal 1B9, 1B12, 3B10, 2G7, 7C5, 9D2 y 3G4, preferentemente de 9D2 o 3G4, y más preferentemente de 3G4, tal como se presenta en la Tabla 4; no procederán de un paciente con una enfermedad y no inhibirán significativamente las reacciones de coagulación *in vitro*, causando una trombosis significativa *in vivo* o tendrán actividades anticoagulante del lupus.

Preferentemente, dichos anticuerpos mostraran también una mejora en las propiedades estructurales o en la gama o grado de propiedades funcionales ventajosas, en estudios controlados, en comparación con un anticuerpo de la bibliografía, tal como la IgG, que tiene una mayor afinidad o que demuestra una unión mejorada con células endoteliales activadas, una inhibición incrementada de la proliferación de células endoteliales o angiogénesis, una localización mejorada de los vasos sanguíneos tumorales, efectos anticancerosos y/o antivirales.

Aspectos particulares de la invención se basan por tanto en la sorprendente y original generación de anticuerpos, lograda por los inventores, que tiene las propiedades anteriores, otras propiedades descritas y propiedades ventajosas intrínsecas. Ahora que se ha proporcionado un panel de anticuerpos preferidos, y una diversidad de anticuerpos particularmente preferidos, la presente invención incluye además una clase de anticuerpos de especificidad epitópica definida, donde esos anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, compiten eficazmente con el anticuerpo monoclonal 1B9, 1B12, 3B10, 2G7, 7C5, 9D2 o 3G4, preferentemente con 9D2 o 3G4, y más preferentemente con 3G4 (ATCC 4545), por la unión con el antígeno, de tal manera que se unen esencialmente al mismo epítope que el del anticuerpo monoclonal 1B9, 1B12, 3B10, 2G7, 7C5, 9D2 o 3G4, preferentemente con 9D2 o 3G4 y más preferentemente con 3G4 (ATCC 4545).

La invención, tal y como se reivindica, se habilita de acuerdo con la presente memoria descriptiva y referencias tecnológicas, conocimiento técnico y materiales de partida, fácilmente disponibles. No obstante, en nombre del presente solicitante, Board of Reagents, The University of Texas System, se presentaron muestras de la línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 3G4 para su depósito en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, Estados Unidos de América. Las muestras las presentó Avid Bioservices, Inc. 14272 Franklin Avenue, Tustin, CA 92780, Estados Unidos de América, una filial de la firma concesionaria, Peregrine Pharmaceuticals, Inc., durante la semana que empezó el 8 de Julio de 2002, y se recibieron el 10 y el 12 de julio de 2002, demostrando ser viables, y se las proporcionó el número de acceso ATCC, PTA 4545 el 30 de Julio de 2002.

Este depósito se realizó según las estipulaciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos de Procedimientos de Patente y las regulaciones de los mismos (Tratado de Budapest). El hibridoma estará disponible en la ATCC según los términos del Tratado de Budapest con la expedición de una patente US con reivindicaciones pertinentes. La disponibilidad del hibridoma depositado no debe considerarse como una autorización para llevar a la práctica la invención transgrediendo los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

A la luz del panel de anticuerpos, los anticuerpos preferidos y las técnicas descritas en el presente documento y conocidas en la técnica, aquellos con experiencia habitual en la técnica se encuentran ahora provistos de una nueva clase de anticuerpos que se unen a aminofosfolípidos o a fosfolípidos aniónicos y que tienen propiedades ventajosas.

Estos anticuerpos son "similares" o "se basan en" los anticuerpos monoclonales 1B9, 1B12, 3B10, 2G7, 7C5, 9D2o3G4. Preferentemente, los anticuerpos de la invención son "anticuerpos basados en 9D2 o similares a 9D2", y más preferentemente, los anticuerpos de la invención son "anticuerpos basados en 3G4 o similares a 3G4". La siguiente descripción de anticuerpos "similares" se proporciona en términos del anticuerpo 3G4 (ATCC 4545) por simplicidad, pero se incorpora específicamente en el presente documento por referencia, como aplicable a cada uno de los anticuerpos 1B9, 1B12, 3B10, 2G7, 7C5 y 9D2.

Un anticuerpo similar a 3G4 es un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une sustancialmente al mismo epítope que el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC 4545) o que se une a al menos un primer aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS, esencialmente en el mismo epítope que el del anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC 4545). Preferentemente el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, se unirá al mismo epítope que el del anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC 4545).

Las expresiones "que se une a aproximadamente, sustancialmente o esencialmente al mismo, o al mismo epítope que" el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC 4545) significa que un anticuerpo "reacciona en forma cruzada" con el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC 4545). "Anticuerpos que reaccionan en forma cruzada" son aquellos que reconocen, se unen a o tienen inmunoespecificidad por sustancialmente o esencialmente el mismo, o el mismo epítope, sitio epitópico o epítope de fosfolípido aniónico o de aminofosfolípido común que el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC 4545) de tal manera que puedan competir eficazmente con el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC 4545) por la unión con al menos un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, más que un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, o con todos los aminofosfolípidos o fosfolípidos aniónicos a los cuales se une el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC 4545). Los "anticuerpos 3G4 que reaccionan en forma cruzada" se denominan de manera concisa "anticuerpos similares al 3G4" y "anticuerpos basados en el 3G4" y en el presente documento dichos términos se usan indistintamente y se aplican a composiciones, usos y métodos.

La identificación de uno o más anticuerpos que se unen a aproximadamente, sustancialmente, esencialmente, o al mismo epítope, como el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC 4545) es un asunto técnico directo conocido como 3G4 que con sus propiedades ventajosas ha sido proporcionado. Como la identificación de anticuerpos que reaccionan en forma cruzada se determina en comparación con un anticuerpo de referencia, se comprenderá que la determinación real del epítope al cual se une el anticuerpo de referencia (3G4) y el anticuerpo de prueba, no se requiere de ninguna manera a fin de identificar un anticuerpo que se una al mismo o sustancialmente el mismo epítope como el anticuerpo monoclonal 3G4. Sin embargo en el presente documente se incluye información considerable sobre el epítope unido por el 3G4 y se puede llevar a cabo adicionalmente un mapeo del epítope.

La identificación de anticuerpos que reaccionan en forma cruzada puede determinarse fácilmente usando cualquiera de una variedad de ensayos de selección inmunológica en los que puede evaluarse la competencia por el anticuerpo. Todos esos ensayos son rutinarios en la técnica y adicionalmente se describen con detalle en la presente memoria. Cada una de las patentes US Nos 6.342.219 y 6.342.221 a las que se hace referencia es con el propósito de incluir un complemento aún adicional para la presente descripción, concerniente a como producir anticuerpos que se unan al mismo o sustancialmente o esencialmente al mismo epítope que un anticuerpo determinado, tal como el 3G4, o que compitan eficazmente con un anticuerpo determinado por la unión a un antígeno.

Por ejemplo, cuando los anticuerpos de ensayo que vayan a examinarse se obtengan de diferentes fuentes animales o inclusive sean de un isotipo diferente, se puede emplear un ensayo de competencia simple en el que los anticuerpos de control (3G4) y de ensayo se mezclen (o adsorban previamente) y se apliquen a una composición antigénica de aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS. Por "composición antigénica de aminofosfolípido o fosfolípido aniónico" se entiende cualquier composición que contenga un antígeno de unión al 3G4, como se describió en la presente memoria, y como se describe en la Tabla 4. De esta manera, los protocolos basados en los ensayos ELISA y en las transferencias de Western son convenientes para su uso en dichos estudios de competencias simples.

En ciertas realizaciones se podrían mezclar previamente los anticuerpos de control (3G4) con cantidades variables de anticuerpos de ensayo (por ejemplo1:10 o 1:100) durante un período de tiempo antes de aplicar a una composición antigénica. En otras realizaciones, el control y las cantidades variables de anticuerpos de ensayo pueden mezclarse simplemente durante la exposición a la composición antigénica. En todo caso, mediante el uso de especies o anticuerpos secundarios del isotipo, se podrán detectar solamente los anticuerpos de control unidos, cuya unión se reducirá por la presencia de un anticuerpo de prueba que reconozca sustancialmente el mismo epítope.

Al llevar a cabo un estudio de competencia por anticuerpos, entre un anticuerpo de control y cualquier anticuerpo de prueba (sin importar la especie o isotipo), primero puede marcarse el control (3G4) con un marcador detectable, tal como, por ejemplo, biotina o un marcador enzimático (o incluso radioactivo) para permitir la identificación posterior. En estos casos, los anticuerpos de control marcados con los anticuerpos de ensayo a examinar se mezclarían previamente o se incubarían a varias proporciones (por ejemplo1:10, 1:100 o 1:1000) y (opcionalmente después de un periodo apropiado) después se ensayaría la reactividad de los anticuerpos de control marcados y se compararían éstos con un valor de control en el que en la incubación no se haya incluido ningún anticuerpo de prueba potencialmente competidor.

El ensayo puede ser nuevamente cualquiera de una variedad de ensayos inmunológicos basados en la hibridación de anticuerpos, y los anticuerpos de control serían detectados a través de la detección de su marcador, por ejemplo, usando estreptavidina en el caso de anticuerpos marcados con biotina o mediante el uso de un substrato cromogénico con relación a un marcador enzimático (tal como el substrato 3,3'5,5'-tetrametilbencidina (TMB) con la enzima peroxidasa) o simplemente detectando un marcador radioactivo. Un anticuerpo que se une al mismo epítope que los anticuerpos de control, podrá competir eficazmente por la unión y de esta manera reducirá significativamente la unión al anticuerpo de control, como se pone de manifiesto por una reducción en el marcador unido.

La reactividad de los anticuerpos de control (marcados) en ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante, sería el valor alto del control. El valor bajo del control se obtendría incubando los anticuerpos marcados (3G4) con anticuerpos no marcados exactamente del mismo tipo (3G4), cuando la competencia ocurriese y se redujera la unión de los anticuerpos marcados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad de los anticuerpos marcados, en presencia de un anticuerpo de prueba, indica un anticuerpo de prueba que reconoce el mismo epítope, es decir uno que "reacciona en forma cruzada" con el anticuerpo marcado (3G4).

Una reducción significativa es una reducción "reproducible", es decir, observada regularmente, en la unión. Una "reducción significativa" en términos de la presente solicitud se define como una reducción reproducible (en la unión de 3G4 a uno o más aminofosfolípidos o fosfolípidos aniónicos, preferentemente FS, en un ELISA) de al menos aproximadamente 70%, aproximadamente 75% o aproximadamente 80% en cualquier proporción que se encuentre entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:1000. Los anticuerpos con actividades de bloqueo cruzado, incluso más rigurosas, exhibirán una reducción reproducible (en la unión del 3G4 a uno o más aminofosfolípidos o fosfolípidos aniónicos, preferentemente FS, en un ELISA u otro ensayo apropiado) de al menos aproximadamente 82%, aproximadamente 85%, aproximadamente 88%, aproximadamente 90%, aproximadamente 92%, o aproximadamente 95%o valor similar, en cualquier proporción entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:1000. El bloqueo cruzado, completo o casi completo, tal como la exhibición de una reducción reproducible en la unión del 3G4 a uno o más aminofosfolípidos o fosfolípidos aniónicos de aproximadamente 97% o aproximadamente 96% o valor similar, aunque de ninguna manera requerido para llevar a la practica la invención, verdaderamente no se excluye.

En cuanto a los anticuerpos de segunda generación en conjunto, la competencia puede medirse con referencia a un anticuerpo que se una al menos a la fosfatidilserina, donde el anticuerpo de segunda generación compita eficazmente por la unión a la fosfatidilserina; en referencia a un anticuerpo que se una al menos al ácido fosfatídico, donde el anticuerpo de segunda generación compita eficazmente por la unión al ácido fosfatídico; en referencia a un anticuerpo que al menos se una al fosfatidilinositol; donde el anticuerpo de segunda generación compita eficazmente por la unión al fosfatidilinositol; en referencia a un anticuerpo que al menos se una al fosfatidilglicerol, donde el anticuerpo de segunda generación compita eficazmente por la unión al fosfatidilglicerol; en referencia a un anticuerpo que se una al menos a la cardiolipina, donde el anticuerpo de segunda generación compita eficazmente por la unión a la cardiolipina; y opcionalmente en referencia a un anticuerpo que se una al menos a la fosfatidiletanolamina, donde el anticuerpo de segunda generación compita eficazmente por la unión a la fosfatidiletanolamina.

En ciertas realizaciones los anticuerpos de segunda generación pueden medirse en referencia a un anticuerpo que se una a al menos a un primer o segundo aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, y donde el anticuerpo de segunda generación compita eficazmente por la unión al primer y segundo aminofosfolípido o fosfolípido aniónico; en referencia a un anticuerpo que se una a al menos un primer, segundo y tercer aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, y donde el anticuerpo de segunda generación compita eficazmente por la unión al primer, segundo y tercer aminofosfolípido o fosfolípido aniónico; en referencia a un anticuerpo que se una a al menos un primer, segundo, tercer y cuarto aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, y donde el anticuerpo de segunda generación compita eficazmente por la unión al primer, segundo, tercer y cuarto aminofosfolípido o fosfolípido aniónico; o en referencia a un anticuerpo que se una a al menos un primer, segundo, tercer, cuarto y quinto aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, y donde el anticuerpo de segunda generación compita eficazmente por la unión al primer, segundo, tercer, cuarto y quinto aminofosfolípido o fosfolípido aniónico.

En realizaciones adicionales, un anticuerpo de segunda generación puede caracterizarse como un anticuerpo que exhiba una unión significativa a al menos un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, una unión no detectable a un fosfolípido neutro que contenga colina y que compita eficazmente con un anticuerpo monoclonal de la invención, preferentemente el 3G4 (ATCC 4545).

En realizaciones particulares el anticuerpo exhibe una unión significativa a los fosfolípidos aniónicos FS, AF, FI, FG y CL; tiene un perfil de unión fosfolipídico de FS=AF=FI=FG >CL>>FE, donde > indica una diferencia de al menos 2 veces en la unión e >> indica una diferencia de al menos 10 veces en la unión a dichos fosfolípidos; exhibe una unión no detectable a la fosfatidilcolina o a la esfingomielina; y compite eficazmente con el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC 4545) por la unión a cada uno de los fosfolípidos aniónicos FS, AF, FI, FG y CL.

Preferentemente los anticuerpos de segunda generación tendrán las características anteriores y exhibirán también un unión significativo a al menos un fosfolípido aniónico presente en la superficie celular de células activadas, divididas, dañadas, apoptóticas o viralmente infectadas. Más preferentemente el anticuerpo inhibe también significativamente la

proliferación de células endoteliales en división, sin alterar significativamente las células inactivas, y más preferentemente, no tiene actividades anticoagulantes del lupus significativas.

Funcionalmente los anticuerpos de segunda generación suprimirán preferentemente la angiogénesis, tendrán un efecto antitumoral y un efecto antiviral, preferentemente *in vivo* y más preferentemente lo harán sin causar complicaciones trombóticas significativas en animales o pacientes. De esta manera, los anticuerpos preferidos poseen las propiedades combinadas de un agente antiangiogénico, vascular antitumoral, antitumoral y antiviral.

La invención esta ilustrada por el anticuerpo monoclonal 3G4, producido por el hibridoma ATCC 4545, o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo monoclonal. Otro aspecto de la invención es un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une sustancialmente al mismo epítope que el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC 4545).

En las siguientes descripciones de las composiciones, inmunoconjugados, productos farmacéuticos, combinaciones, cócteles, kits, primero y segundos usos médicos y todos los métodos de conformidad con la invención, los términos "anticuerpos" e "inmunoconjugados", o una región de unión al antígeno de los mismos, al menos que se mencione específicamente de otra manera o que se aclare a partir de la terminología científica, se refiere a una variedad de anticuerpos antiaminofosfolípidos o antifosfolípidos aniónicos, así como anticuerpos específicos que reaccionen de manera cruzada con el 3G4.

Los términos "anticuerpos" e "inmunoglobulina", tal como se usan en la presente memoria, se refieren ampliamente a cualquier agente de unión inmunológico, incluyendo anticuerpos monoclonales y policlonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos son asignados a una de cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. Varias de estas son divididas adicionalmente en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y similares. Los dominios constantes de cadena pesada, que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas son denominados α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Generalmente, cuando en la invención se usan anticuerpos en vez de regiones de unión al antígeno, se prefieren la IgG y/o la IgM, porque son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y porque se producen más fácilmente en un entorno de laboratorio. Las "cadenas ligeras" de anticuerpos de mamíferos son asignadas a una de dos tipos claramente distintos: kappa (κ) y lambda (γ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Esencialmente no hay preferencia para el uso de las cadenas ligeras κ o γ en los anticuerpos de la invención.

El uso de anticuerpos monoclonales (MAbs) o derivados de los mismos es mucho más preferido. Los MAbs son reconocidos por tener ciertas ventajas, por ejemplo, reproducibilidad y producción a gran escala, lo que hace que sean convenientes para el tratamiento clínico. La invención proporciona por tanto anticuerpos monoclonales de origen murino, de ser humano, mono, rata, hámster, conejo e incluso de rana o pollo. Generalmente se prefieren los anticuerpos monoclonales murinos, humanos o humanizados.

Como comprenderán los expertos en la técnica, los reactivos de unión inmunológica comprendidos en el término "anticuerpo" se amplían a todos los anticuerpos de todas las especies, y a fragmentos de unión al antígeno de los mismos, incluyendo anticuerpos diméricos, triméricos y multiméricos; anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos y humanizados; anticuerpos recombinantes, modificados por ingeniería genética y camelizados (de camélidos), y fragmentos de los mismos.

El término "anticuerpo" se usa por tanto para referirse a cualquier molécula similar a un anticuerpo, que tenga una región de unión al antígeno, y este término incluye los fragmentos de anticuerpos tales como Fab', Fab, $F(ab)'_2$, anticuerpos de dominio sencillo (DABs), Fv, scFv (Fv de cadena sencilla), anticuerpos lineales, diacuerpos, anticuerpos camelizados y similares. Los procedimientos para preparar y usar varias construcciones basadas en anticuerpos y fragmentos, son bien conocidos en la técnica (ver Kabat *et al.*, 1991). Los diacuerpos, en particular, se describen además en la EP 404,097 y en la WO 93/11161, cada una incorporada específicamente en la presente memoria como referencia; mientras que los anticuerpos lineales se describen adicionalmente en Zapata *et al.* (1995).

En ciertas realizaciones las composiciones de la invención comprenden al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, que comprende al menos una primera región variable que incluye una región de una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 75%, en forma más preferente de al menos aproximadamente 80%, más preferentemente de al menos aproximadamente 85%, más preferentemente de al menos aproximadamente 90% y en la forma más preferente de al menos aproximadamente 95% o similar de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 4; en donde ese anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico mantiene al menos sustancialmente las propiedades biológicas de los anticuerpos antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico de la invención, tal como se ilustra mediante el anticuerpo 3G4.

La identidad u homología con respecto a estas secuencias de anticuerpos antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, de la invención, se define en la presente memoria como el porcentaje de restos de aminoácidos en una

secuencia candidato, que sean idénticas a las secuencias de la SEC ID NO: 2oSEC ID NO: 4; o a la secuencia de otro anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, de la invención, después de alinear las secuencias e introducir vacíos, si es necesario para lograr la identidad porcentual máxima de las secuencias. El mantenimiento de propiedades biológicas sustancialmente iguales, o inclusive más eficaces, del anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, usado para la comparación de secuencias, es particularmente importante. Esas comparaciones se llevan a cabo fácilmente, por ejemplo, usando uno o más de los diferentes ensayos descritos con detalle en la presente memoria.

En ciertas realizaciones preferidas, los anticuerpos antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, de la invención, comprenden al menos una primera región variable que incluye una región de secuencias de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 4, ilustrada por regiones variables que incluyen una región de secuencias de aminoácidos codificada por las secuencias de ácidos nucleicos de la SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 3. Esas secuencias son las secuencias de Vh y Vκ del 3G4 ScFv que comprende las CDR1-3 (regiones determinantes de la complementariedad) de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras.

En otras realizaciones preferidas se proporcionan anticuerpos de segunda generación que tienen propiedades mejoradas o superiores, en comparación con un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, original, tal como el 3G4 (ATCC 4545).

En ciertas realizaciones los anticuerpos empleados serán anticuerpos "humanizados", en parte humanos o humanos. Los anticuerpos "humanizados" son generalmente anticuerpos monoclonales quiméricos de ratón, rata o de otra especie no humana, que contienen dominios de región constante y/o variable humana ("anticuerpos quiméricos en parte humanos"). Varios anticuerpos monoclonales humanizados para el uso en la invención serán anticuerpos quiméricos donde al menos una primera región de unión al antígeno, o región determinante de la complementariedad (CDR), de un ratón, rata u otro anticuerpo monoclonal no humano se encuentre unida funcionalmente a, o "injertada" en, una región constante o "región marco conservada (*framework*)" del anticuerpo humano.

Los anticuerpos monoclonales "humanizados" para su uso en la presente memoria pueden ser también anticuerpos monoclonales de especies no humanas en donde uno o más aminoácidos seleccionados han sido intercambiados por aminoácidos observados más comúnmente en anticuerpos humanos. Esto puede conseguirse fácilmente a través del uso de tecnología recombinante de rutina, particularmente la mutagénesis específica al sitio.

Anticuerpos totalmente humanos en vez que "humanizados" pueden ser también preparados y usados en la invención. Dichos anticuerpos humanos pueden ser obtenidos a partir de sujetos saludables, obteniendo simplemente una población de linfocitos de la sangre periférica, mixtos, de un sujeto humano, incluyendo células presentadoras de antígeno y células productoras de anticuerpos, y estimulando la población celular *in vitro* mediante la mezcla con una cantidad inmunogénicamente eficaz de una muestra de aminofosfolípido o fosfolípido aniónico. Las células humanas productoras de anticuerpo del antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, una vez obtenidas, se usan en la producción del hibridoma y/o del anticuerpo recombinante.

Técnicas adicionales para la producción de anticuerpos monoclonales humanos incluyen la inmunización de un animal transgénico, preferentemente un ratón transgénico, que comprende una biblioteca de anticuerpos humanos con cantidad inmunogénicamente eficaz de una muestra de aminofosfolípido o fosfolípido aniónico. Esto genera también células humanas productoras de anticuerpos antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, para la manipulación adicional en la producción del hibridoma y/o del anticuerpo recombinante, con la ventaja de que células de bazo, en vez que células de la sangre periférica, pueden ser obtenidas fácilmente a partir del animal o ratón transgénico.

Los anticuerpos de conformidad con la invención pueden ser preparados fácilmente seleccionando un anticuerpo que sustancialmente reaccione en forma cruzada o compita con el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545). Los procesos y métodos de preparación, apropiados, comprenden:

(a) preparar células productoras de anticuerpos candidatos; y

(b) seleccionar de las células productoras de anticuerpos candidatos un anticuerpo que sustancialmente reaccione en forma cruzada o compita con el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545).

Un proceso para preparar células productoras de anticuerpos apropiadas y obtener anticuerpos a partir de las mismas, puede llevarse a cabo in situ en un paciente determinado. Es decir, el simple hecho de proporcionar una cantidad inmunogénicamente eficaz de una muestra de aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, inmunogénico, a un paciente, dará por resultado una generación del anticuerpo apropiada. De esta manera, el anticuerpo se "obtiene" aún a partir de la célula productora de anticuerpos, pero no tiene que ser aislado de un huésped y proporcionado posteriormente a un paciente, y puede ser localizado espontáneamente en la vasculatura de un tumor y ejercer sus efectos antitumorales biológicos. Sin embargo esas realizaciones no se prefieren actualmente.

Las células productoras de anticuerpos, apropiadas, pueden ser también obtenidas y los anticuerpos pueden ser posteriormente aislados y/o purificados, estimulando los linfocitos de la sangre periférica con aminofosfolípido o fosfolípido aniónico *in vitro*.

Otros métodos comprenden administrar a un animal una composición inmunizadora que comprenda al menos un primer componente inmunogénico de aminofosfolípido o fosfolípido aniónico y seleccionar, del animal inmunizado, un anticuerpo que sustancialmente reaccione en forma cruzada o que compita con el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545). Estos métodos generalmente comprenden:

(a) inmunizar a un animal administrándole al menos una dosis, y opcionalmente más de una dosis, de una composición que comprenda una cantidad inmunogénicamente eficaz de un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico inmunogénico; y

(b) obtener una célula productora de anticuerpos, apropiada, del animal inmunizado, tal como una célula productora de anticuerpos, que produzca un anticuerpo que sustancialmente reaccione en forma cruzada o compita con el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545).

Una "composición que comprende una cantidad inmunogénicamente eficaz de un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, inmunogénico", preferida, tal como se usa en la presente memoria, es una composición que comprende células endoteliales activadas. Las "células endoteliales activadas" se preparan preferentemente colocando células endoteliales bajo al menos una primera condición, o en contacto con al menos un primer factor, que active las células endoteliales, y/o que simule el ambiente de un tumor, por un tiempo eficaz para mantener sustancialmente la viabilidad de las células y estimular la expresión de al menos un fosfolípido aniónico en la superficie de las células endoteliales.

Ejemplos de "condiciones" eficaces para preparar células endoteliales activadas son los ambientes hipóxicos y/o ácidos. Ejemplo de "factores" eficaces para preparar células endoteliales activadas son las concentraciones eficaces de H_2O_2, trombina, citocina(s) inflamatoria(s), tales como IL-1α, IL-1β, interferón o TNFα, y generalmente combinaciones de condiciones y/o factores que simulen el ambiente de un tumor.

Sin importar la naturaleza del proceso de inmunización, o del tipo de animal inmunizado, células productoras de anticuerpos, apropiadas, se obtienen a partir del animal inmunizado, y preferentemente, son manipuladas adicionalmente por la mano del hombre. "Un animal inmunizado", tal como se usa en la presente memoria, es un animal no humano, al menos que se mencione expresamente de otra manera. Aunque se puede usar una célula productora de anticuerpos, en la forma más preferente, se obtienen células del bazo como la fuente de células productoras de anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos pueden ser usadas en un proceso preparativo que comprenda:

(a) fusionar una célula productora de anticuerpos antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, apropiada, con una célula inmortal para preparar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal de conformidad con la invención; y

(b) obtener un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, apropiado, de conformidad con la invención, a partir del hibridoma.

Células productoras de anticuerpos antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, hibridomas y anticuerpos, "apropiados", son aquellos que producen, o existen como, anticuerpos antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, preferentemente anticuerpos que sustancialmente reaccionen en forma cruzada o compitan con el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545).

Los métodos de preparación de anticuerpos monoclonales basados en hibridoma incluyen aquellos que comprende:

(a) inmunizar a un animal administrándole al menos una dosis, y opcionalmente más de una dosis, de una composición que comprenda una cantidad inmunogénicamente eficaz de un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, inmunogénico, preferentemente una composición que comprende células endoteliales activadas;

(b) preparar una recolección de hibridomas productores de anticuerpo monoclonal, a partir del animal inmunizado;

(c) seleccionar de la recolección al menos un primer hibridoma que produzca al menos un primer anticuerpo monoclonal antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, de conformidad con la invención, opcionalmente un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, que sustancialmente reaccione en forma cruzada o compita con el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545); y

(d) cultivar el al menos un primer hibridoma productor de anticuerpos, para proporcionar el al menos un primer anticuerpo monoclonal antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico; y preferentemente

(e) obtener el al menos un anticuerpo monoclonal antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, a partir del al menos un primer hibridoma cultivado.

En la identificación de un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico que sustancialmente reaccione en forma cruzada con el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545), la etapa de selección puede comprender:

(a) poner en contacto una muestra de aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente una muestra de FS, con cantidades eficaces del anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545) y un anticuerpo candidato; y

(b) determinar la capacidad del anticuerpo candidato para reducir sustancialmente la unión del anticuerpo 3G4 al aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente la muestra de FS; en donde la capacidad de un anticuerpo candidato para reducir sustancialmente la unión del anticuerpo 3G4 al aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente la muestra de FS, sea indicativo de un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico que se enlace a sustancialmente el mismo epítope como el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545).

La etapa de selección puede comprender además:

(a) poner en contacto una primera muestra de aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS, con una cantidad de unión eficaz del anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545) y determinar la cantidad de 3G4 que se enlace al aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS;

(b) poner en contacto una segunda muestra de aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS, con una cantidad de unión eficaz del anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545) en combinación con una cantidad de competencia eficaz, de un anticuerpo candidato, y determinar la cantidad de 3G4 que se enlace al aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS, en presencia del anticuerpo candidato; e

(c) identificar un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico que se enlace sustancialmente al mismo epítope que el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545) seleccionando un anticuerpo candidato que reduzca la cantidad de 3G4 que se enlace al aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS, preferentemente en al menos aproximadamente 80%.

Como para la inmunización se usan animales no humanos, los anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de un hibridoma tendrán a menudo una constitución no humana. Esos anticuerpos pueden ser sometidos opcionalmente a un proceso de humanización, injerto o mutación, como es conocido para los experimentados en la técnica y como se describe adicionalmente en la presente memoria. Alternativamente se pueden usar animales transgénicos, tales como ratones, que comprendan una librería genética de anticuerpos humanos. La inmunización de esos animales dará por resultado entonces directamente la generación de anticuerpos humanos apropiados.

Después de la producción de una célula productora de anticuerpo apropiado, en la forma más preferente un hibridoma, ya sea que produzca anticuerpos humanos o no humanos, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo monoclonal pueden ser clonados para preparar un anticuerpo monoclonal "recombinante". Se puede utilizar cualquier técnica de clonación recombinante, incluyendo el uso de PCR^{MR} para cebar la síntesis de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo. Por lo tanto, métodos para la preparación de anticuerpos monoclonales apropiados, aún adicionales, incluyen aquellos que comprenden usar las células productoras de anticuerpos de la siguiente manera:

(a) obtener al menos una primera molécula de ácido nucleico que codifique un anticuerpo de antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, apropiado, o segmento de una célula productora de anticuerpos antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico apropiado, preferentemente un hibridoma; y

(b) expresar la molécula de ácido nucleico o segmento en una célula huésped recombinante para obtener un anticuerpo monoclonal antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, recombinante, de conformidad con la invención.

Sin embargo, se encuentran disponibles otras técnicas recombinantes poderosas que son idealmente convenientes para la preparación de anticuerpos monoclonales recombinantes. Esas técnicas recombinantes incluyen los métodos preparativos de anticuerpos monoclonales basados en una biblioteca de fagémidos, que comprenden:

(a) inmunizar un animal administrando al animal al menos una dosis, y opcionalmente más de una dosis, de una composición que comprenda una cantidad inmunogénicamente eficaz de un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, inmunogénico, preferentemente una composición que comprenda células endoteliales activadas;

(b) preparar una biblioteca de fagémidos de inmunoglobulina combinatoria que exprese el ARN aislado de las células productoras de anticuerpos, preferentemente del bazo, del animal inmunizado;

(c) seleccionar, de la biblioteca de fagémidos, al menos un primer clon que exprese al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, opcionalmente uno que sustancialmente reaccione en forma cruzada o que compita con el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545);

(d) obtener ácidos nucleicos que codifiquen el anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, a partir de al menos un primer clon seleccionado y que exprese los ácidos nucleicos en una célula huésped recombinante para proporcionar el al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico; y preferentemente (c) obtener el al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, expresado por los ácidos nucleicos obtenidos a partir del al menos un primer clon seleccionado.

Nuevamente, en dichas técnicas basadas en bibliotecas de fagémidos, se pueden emplear animales transgénicos que porten genotecas de anticuerpos humanos, produciendo así anticuerpos monoclonales humanos recombinantes.

Sin importar la manera de preparación de un primer segmento de ácido nucleico de anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, segmentos de ácidos nucleicos de anticuerpos apropiados adicionales, pueden ser preparados fácilmente mediante técnicas estándares de biología molecular. A fin de confirmar que alguna variante, mutante o segmento de ácido nucleico de anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, de segunda generación, es apropiado para el uso en la invención, el segmento de ácido nucleico será analizado para confirmar la expresión de un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, de acuerdo con la invención. Preferentemente la variante, mutante o segmento de ácido nucleico de segunda generación será analizado también para confirmar la hibridación en condiciones estándares, más preferentemente condiciones de hibridación rigurosas estándares. Las condiciones de hibridación apropiadas, ejemplares, incluyen la hibridación en aproximadamente 7% de dodecilsulfato sódico (SDS), aproximadamente 0,5 M de $NaPO_4$, aproximadamente 1 mM de EDTA a aproximadamente 50°C; y lavado con aproximadamente 1% de SDS a aproximadamente 42°C.

Como una variedad de anticuerpos monoclonales recombinantes, ya sea de origen humano o no humano, pueden ser preparados fácilmente, cualquiera de los métodos de tratamiento de la invención puede ser ejecutado proporcionando al animal o paciente al menos un primer segmento de ácido nucleico que exprese una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, en el paciente. El "segmento de ácido nucleico que expresa un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, similar a 3G4 o basado en 3G4" se encontrará generalmente en la forma de al menos una construcción de expresión y puede encontrarse en la forma de una construcción de expresión comprendido dentro de un virus o dentro de una célula huésped recombinante. Los vectores de terapia genética preferidos de la invención, serán generalmente lectores virales, tales como aquellos comprendidos en un retrovirus recombinante, virus de herpes simple (HSV), adenovirus, virus adenoasociado (AAV), citomegalovirus (CMV), y similares.

Derivados de Duramicina Impermeables a las Células: La invención proporciona además construcciones de péptidos de unión a la fosfatidiletanolamina (PE) sustancialmente impermeables a la célula y derivados, que comprenden al menos un primer péptido de unión a la PE, que ha sido modificado para formar una construcción de unión a la FE, sustancialmente impermeable a la célula.

Preferentemente la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden, en un transportador farmacéuticamente aceptable, una cantidad biológica o terapéuticamente eficaz de al menos un primer construcción de unión a la FE, sustancialmente impermeable a la célula, que comprende al menos un primer péptido de unión a la FE que ha sido modificado para formar una construcción de unión a la FE, sustancialmente impermeable a la célula. De esta manera, las construcciones de unión a la FE, sustancialmente impermeable a la célula, son construcciones para usos farmacéuticos, farmacológicos y terapéuticos, es decir, para usos médicos, preferentemente el uso en el tratamiento de infecciones virales. En ciertas realizaciones la invención proporciona una construcción de unión a la PE, sustancialmente impermeable a la célula, diferente a la cinamicina unida a biotina.

Más preferentemente, los derivados de péptidos de unión a la FE, sustancialmente impermeables a la célula, de la invención, son derivados de péptidos de duramicina, sustancialmente impermeables a la célula, y composiciones farmacéuticas de los mismos. El péptido de duramicina es modificado típicamente para formar un derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula, por unión operativa a al menos un primer grupo impermeable a la célula. La unión operativa de un grupo impermeable a la célula podría ser a través del resto lisina en la posición 2 del aminoácido en la SEC ID NO: 9.

El grupo impermeable de célula puede ser una carga positiva o negativa a pH fisiológico o puede ser polar. Los grupos ejemplares incluyen los grupos sulfato, sulfonato, fosfato, carboxilo, fenólico, ion de amonio cuaternario y amina. Una composición farmacéutica que comprende duramicina unida a biotina es un ejemplo particular dentro de la invención.

Duramicinas sustancialmente impermeables a la célula pueden ser también unidas operativamente a un azúcar, oligosacárido o polisacárido, aminoácido, péptido, polipéptido, proteína o a un grupo polialcohol. Ciertas duramicinas impermeables a las células son aquellas unidas operativamente a una proteína transportadora inerte, tal como neutravidina, estreptavidina, albúmina o una proteína transportadora de inmunoglobulina inerte, de las cuales se prefiere particularmente la duramicina unida a la IgG humana (HIgG). Otros ejemplos de duramicinas impermeables a la célula son aquellas unidas a agentes de direccionamiento, preferentemente aquellos que se unen a una célula tumoral, a la vasculatura del tumor o estroma del tumor o a una célula viralmente infectada. Ejemplos de agentes de direccionamiento que se unen a un componente de una célula tumoral, a la vasculatura tumoral o al estroma tumoral, se describen en las patentes US Nos 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289, y 6.036.955.

Tratamiento de Tumores: La invención proporciona además composiciones que comprenden al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, purificado, o fragmento de unión al antígeno o inmunoconjugado, del mismo, opcionalmente uno que se enlace esencialmente al mismo epítope que el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545), o un derivado de péptido de unión a la PE, sustancialmente impermeable a la célula, preferentemente un derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula. Esas composiciones son preferentemente composiciones farmacéuticamente aceptables, que incluyen aquellas formuladas para la administración parenteral, tales como para la administración intravenosa, o para la administración como un liposoma o como un aerosol.

La invención proporciona cierto número de métodos y usos de los anticuerpos antiaminofosfolípidos o antifosfolípidos aniónicos, incluyendo los anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con 3G4, los similares al 3G4 o los basados en el 3G4, y los derivados de duramicina sustancialmente impermeables a la célula. Con respecto a todos los métodos, los términos "un", "una", "unos" y "unas", se usan para significar "al menos uno", "al menos un primer", "uno o más" o "una pluralidad" de etapas en los métodos descritos, excepto en donde se mencione específicamente. Esto es particularmente relevante para las etapas de administración en los métodos de tratamiento. De esta manera no sólo pueden emplearse dosis diferentes con la invención, sino que se pueden usar diferentes números de dosis, por ejemplo inyecciones o inhalaciones, incluyendo inyecciones o inhalaciones múltiples. Se pueden usar productos terapéuticos combinados, administrados antes, después o durante la administración del anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico o inmunoconjugado, o el derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula.

Se proporcionan diversos métodos y usos *in vitro* útiles ue tienen importantes implicaciones biológicas. Primero se proporcionan métodos de, y usos en, la unión de aminofosfolípidos o fosfolípidos aniónicos, preferentemente FS o FE, que comprenden generalmente poner en contacto eficazmente una composición que comprenda un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS o FE, con al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, opcionalmente un anticuerpo que se enlace sustancialmente al mismo epítope como el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545), o con un derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula. El "contacto" es en condiciones eficaces para permitir la formación de complejo de unión, y se detectan cualquiera de los complejos así formados. Los métodos y usos de detección pueden ser usados con relación a muestras biológicas, por ejemplo, en el diagnóstico de apoptosis, tumores y células viralmente infectadas, y también se proporcionan kits de diagnóstico basados en los mismos.

Se proporcionan métodos y usos para inhibir la proliferación, que usan preferentemente los anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno e inmunoconjugados de la invención. Métodos para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales, comprenden generalmente poner en contacto una población de células o tejidos que incluya una población de células endoteliales, con una composición que comprenda una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, opcionalmente uno que se enlace sustancialmente al mismo epítope que el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545) o un fragmento de unión al antígeno, del mismo, en condiciones eficaces para inhibir la proliferación y/o migración de la célula endotelial.

Los métodos y usos anteriores pueden ser llevados a cabo *in vitro* e *in vivo*, en el último caso, en donde los tejidos o células son colocados en un animal y el anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico es administrado al animal. En ambos casos los métodos y usos se convierten en métodos y usos para inhibir la angiogénesis, que comprenden poner en contacto un tejido que contiene, o una población de, vasos sanguíneos potencialmente angiogénicos con una composición antiangiogénica que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, opcionalmente una que se enlace a sustancialmente el epítope como el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545), o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en condiciones eficaces para inhibir la angiogénesis.

En donde poblaciones de vasos sanguíneos potencialmente angiogénicos se mantengan ex vivo, la PRESENTE invención tiene utilidad en programas de descubrimiento de fármacos. En ensayos de selección *in vitro* con controles positivos y negativos confiables, son útiles como una primera etapa en el desarrollo de fármacos para inhibir o promover la angiogénesis, así como en la delineación de información adicional respecto al proceso angiogénico. En donde la población de vasos sanguíneos angiogénicos potencialmente se encuentre localizada en un animal o paciente, la composición antiangiogénica es administrada al animal como una forma de terapia.

Las terapias antiangiogénicas y antivasculares son proporcionadas en términos de animales y pacientes que tienen, o se encuentran en riesgo de desarrollar, alguna enfermedad o trastorno caracterizado por una vascularización no deseada, inapropiada, aberrante, excesiva y/o patológica. Es bien conocido por los experimentados en la técnica que como la angiogénesis aberrante ocurre en una amplia variedad de enfermedades y trastornos, una terapia antiangiogénica determinada, una vez que se ha demostrado que es eficaz en algún sistema de modelo aceptable, puede ser usada para tratar toda la gama de enfermedades y trastornos relacionados con la angiogénesis.

Los métodos y usos de la invención sirven particularmente para usarse en animales y pacientes que tengan, o que se encuentren en riesgo de desarrollar, cualquier forma de tumor vascularizado; degeneración macular, incluyendo la

degeneración macular relacionada con la edad; artritis, incluyendo la artritis reumatoide; aterosclerosis y placas ateroscleróticas; retinopatía diabética y otras retinopatías; hiperplasias tiroideas, incluyendo la enfermedad de Grave; hemangioma; glaucoma neovascular; y psoriasis.

Los métodos y usos de la invención sirven además para el tratamiento de animales y pacientes que tienen, o que se encuentran en riesgo de desarrollar, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, y restenosis vascular, incluyendo restenosis después de angliopasia. Otros fines pretendidos de los métodos y usos terapéuticos son animales y pacientes que tengan, o que se encuentran en riesgo de desarrollar, angiofibroma, dermatitis, endometriosis, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, enfermedades y trastornos inflamatorios, granuloma piogénico, escleroderma, sinovitis, tracoma y adhesiones vasculares.

Como se describe en la patente US No 5.712.291, cada uno de los grupos de tratamiento anteriores no son de ninguna manera exhaustivos de los tipos de afecciones que van a ser tratadas por la invención. La patente US 5.712.291 identifica cierto número de otras afecciones que pueden ser tratadas eficazmente por un producto terapéutico antiangiogénico; el propósito de mostrar que el tratamiento de todas las enfermedades angiogénicas representa un concepto unificado, una vez que una categoría definida de compuestos inhibidores de la angiogénesis ha sido descrito y reivindicado (en este caso anticuerpos antiaminofosfolípidos o antifosfolípidos aniónicos, opcionalmente aquellos que se unen a sustancialmente el mismo epítope como el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545); y el propósito de mostrar que el tratamiento de todas las enfermedades angiogénicas es habilitado por datos únicamente de un solo sistema de modelo.

Además del tratamiento de enfermedades angiogénicas y vasculares, aspectos importantes y unificados de la invención son composiciones y métodos para el tratamiento de animales y pacientes que tengan, o que se encuentren en riesgo de desarrollar, cáncer. Todos los métodos y usos del tratamiento de cáncer comprende la administración o uso de al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, purificado, o un fragmento de unión al antígeno o inmunoconjugado del mismo, opcionalmente uno que se una esencialmente al mismo epítope como el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545), o un derivado de péptido de unión a la FE sustancialmente impermeable a la célula, preferentemente un derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula. Dichas construcciones se administran en cantidades terapéuticamente eficaces a animales o a pacientes con cáncer.

Los métodos de tratamiento de cáncer de la invención, inclusive aquellos que usan los anticuerpos, no se basan solamente en ejercer efectos antivasculares y/o antiangiogénicos. Los métodos y usos del tratamiento del cáncer de la invención son convenientes para el tratamiento de todas las formas de cáncer, incluyendo animales y pacientes, que tengan, o que se encuentren en riesgo de desarrollar, un tumor sólido vascularizado, un tumor metastásico o metástasis de un tumor primario.

Tanto los anticuerpos no conjugados o "anticuerpos desnudos" y fragmentos de los mismos, como los inmunoconjugados en los que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, del mismo, se encuentra unido operativamente a un agente terapéutico, pueden ser usados en los aspectos contra el cáncer, de la invención. Al menos que se mencione específicamente de otra manera o que se aclare en términos científicos, los términos "anticuerpo y fragmento del mismo", tal como se usa en la presente memoria, significan entonces un anticuerpo "no conjugado o desnudo" o fragmento, que no esté unido a otro agente, particularmente un agente terapéutico o de diagnóstico. Estas definiciones no excluyen modificaciones del anticuerpo, tal como, a manera de ejemplo, modificaciones para mejorar la semivida biológica, afinidad, avidez u otras propiedades del anticuerpo, o combinaciones del anticuerpo con otros efectores.

En los métodos basados en inmunoconjugados, para tratamiento de cáncer, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, del mismo, se une funcionalmente a cualquiera de uno o más de una variedad de agentes biológicos, terapéuticos y/o los llamados segundos agentes anticancerosos (el anticuerpo antiaminofosfolípido o anti- fosfolípido aniónico mismo, es el primer agente antiangiogénico), lo cual puede tener un efecto anticanceroso directo o indirecto.

Por consiguiente la invención proporciona además métodos y usos para administrar agentes terapéuticos o de diagnóstico, seleccionados a tumores. Esas realizaciones comprenden administrar a un animal o paciente que tenga un tumor, una cantidad biológicamente eficaz de una composición que comprenda al menos un primer inmunoconjugado en el que un agente de diagnóstico o terapéutico se encuentre funcionalmente unido a un anticuerpo o antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, o fragmento de unión al antígeno del mismo, opcionalmente uno que se enlace sustancialmente al mismo epítope que el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545).

Las composiciones, así como los métodos y usos, de la invención, incluyen entonces composiciones que comprenden un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, opcionalmente uno que se enlace sustancialmente al mismo epítope que el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545), unido funcionalmente a al menos un primer agente biológico, terapéutico o de diagnóstico. Los anticuerpos son enlazados preferentemente a agentes radioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de la apoptosis, fármacos antitubulina, agentes anticelulares, agentes citotóxicos o citocinas (o a fármacos antivirales, como se analiza posteriormente).

Ciertos agentes preferidos para la unión son los agentes de diagnóstico *in vivo*, que permiten por ejemplo, que el conjugado sea usado como un marcador sustitutivo para la quimioterapia.

Los agentes preferidos para el uso en el anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico o conjugados terapéuticos basados en el 3G4, son aquellos que completan o mejoran los efectos del anticuerpo y/o aquellos seleccionados para un tipo de tumor particular o paciente. Los "agentes terapéuticos que complementan o mejoran los efectos del anticuerpo" incluyen los agentes radioterapéuticos, los agentes que mejoran la permeabilidad vascular, ciertas citocinas, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de la apoptosis, y fármacos antitubulina, cualquiera o más de los cuales pueden usarse en la presente memoria.

Los agentes actualmente preferidos son el agente citotóxico, gelonina; citocinas, tales como TNFα, Il-12 y LEC (quimiocina expresada en el hígado); agentes anticancerosos con efectos antiangiogénicos, como los de la Tabla E; agentes anticancerosos que inducen la apoptosis, como los de la Tabla F; y fármacos antitubulina de la familia de combretastatina. Un agente particularmente preferido es el docetaxel.

Las composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer de los animales o pacientes con cáncer pueden usarse también en combinación con otros productos terapéuticos y de diagnóstico. Los usos "combinados" en términos de los anticuerpos antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico o anticuerpos basados en el 3G4, en combinación con agentes terapéuticos, incluyendo también composiciones combinadas, productos farmacéuticos, cócteles, kits, métodos, en donde el agente terapéutico se encuentra en la forma de un profármaco.

Los métodos combinados para el tratamiento del cáncer son aquellos en los cuales al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, purificado, o un fragmento de unión al antígeno o inmunoconjugado, del mismo, opcionalmente una que se enlace esencialmente al mismo epítope que el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545), o un derivado de péptido de unión a la FE, sustancialmente impermeable a la célula, preferentemente un derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula, es administrado a un animal o paciente con cáncer en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un segundo agente terapéutico o anticanceroso.

La invención proporciona además composiciones, composiciones farmacéuticas, kits terapéuticos y cócteles medicinales, que comprenden, opcionalmente en al menos una primera composición o envase, una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, opcionalmente uno que se une sustancialmente al mismo epítope como el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545), o un fragmento de unión al antígeno o inmunoconjugado, del mismo, o derivado de péptido de unión a la FE, sustancialmente impermeable a la célula, preferentemente un derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula; y una cantidad biológicamente eficaz de al menos un segundo agente biológico, componente o sistema, preferentemente al menos un segundo agente terapéutico o anticanceroso.

El "al menos un segundo agente, componente o sistema biológico" será a menudo un agente, componente o sistema terapéutico o de diagnóstico pero puede no serlo. Por ejemplo, el al menos un segundo agente, componente o sistema biológico puede comprender componentes para la modificación del anticuerpo y/o para unir otros agentes al anticuerpo. Ciertos segundos agentes, componentes o sistemas biológicos preferidos son profármacos o componentes para producir y usar profármacos, incluyendo componentes para fabricar el profármaco mismo y componentes para adaptar los anticuerpos de la invención para que funcionen en dichas realizaciones de profármaco o ADEPT.

Cuando la enfermedad a tratadr sea el cáncer, "al menos un segundo agente terapéutico o anticanceroso" será incluido en el kit o cóctel terapéutico. El término "al menos un segundo agente anticanceroso" se selecciona con referencia al anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, construcción 3G4, o un derivado de péptido de unión a la FE, sustancialmente impermeable a la célula, preferentemente un derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula, que es el primer agente anticanceroso. Los anticuerpos de la invención pueden entonces estar combinados con agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, citocinas, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis o inmunotoxinas o coaguligandos anticancerosos. "Agentes quimioterapéuticos" incluyen también genes, vectores, construcciones antisentido y ribozimas.

Los segundos agentes anticancerosos, actualmente preferidos, son agentes anticancerosos con efectos antiangiogénicos, como en la Tabla E; agentes anticancerosos que inducen la apoptosis, como en la Tabla F; y fármacos antitubulina de la familia de la combretastatina. Un agente particularmente preferido es el docetaxel.

En términos de composiciones, kits y/o medicamentos de la invención, las cantidades eficaces, combinadas, de los agentes terapéuticos pueden estar comprendidas dentro de un solo envase o elemento de envase o comprendidas dentro de distintos envases o elementos de envases. Los cócteles serán mezclados generalmente en forma conjunta para el uso combinado. Los agentes formulados para la administración intravenosa serán a menudo los preferidos. También pueden ser incluidos componentes para la formación de imágenes. Los kits pueden comprender también instrucciones para usar el al menos un primer anticuerpo y el uno o más agentes biológicos diferentes incluidos.

Hablando de manera general, el al menos un segundo agente anticanceroso puede ser administrado al animal o paciente en forma sustancialmente simultánea con el anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, un producto terapéutico a base de 3G4 o un derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula; tal como a partir de una composición farmacéutica individual o a partir de dos composiciones farmacéuticas administradas cercanamente una de otra.

Alternativamente, el al menos un segundo agente anticanceroso pueda ser administrado al animal o paciente, en un tiempo secuencial a la administración del anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, producto terapéutico a base de 3G4 o derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula. "En un tiempo secuencial" tal como se usa en la presente memoria, significa "escalonado", de manera tal que al menos un segundo agente anticanceroso sea administrado al animal o paciente en un tiempo distinto a la administración del anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, producto terapéutico a base de 3G4 o derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula. Los dos agentes son administrados en momentos eficazmente separados para permitir que los dos agentes ejerzan sus efectos terapéuticos respectivos, es decir, son administrados a "intervalos de tiempo biológicamente eficaces". El al menos un segundo agente anticanceroso puede ser administrado al animal o paciente, en un tiempo biológicamente eficaz antes del anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, producto terapéutico a base de 3G4 o derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula, o a un tiempo biológicamente eficaz posteriormente a ese producto terapéutico.

La formación de imágenes de tumores también puede llevarse a cabo preferentemente usando un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, o construcción de anticuerpo a base de 3G4, marcados detectablemente. La formación de imágenes de conformidad con la invención puede detectar células preapoptóticas y apoptóticas de manera tal que puede ser usada después de la terapia como un marcador sustitutivo. Alternativamente, como la imagen formada será predictiva de los sitios de unión del producto terapéutico que se vaya a usar, la formación de imágenes puede llevarse a cabo antes del tratamiento. El tratamiento del cáncer puede por tanto realizarse:

(a) formando una imagen de un tumor administrando a un animal o paciente que tenga un tumor, una cantidad diagnósticamente mínima, de al menos un primer agente de unión al tumor, marcados detectablemente, preferentemente un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico o una construcción de anticuerpo a base de 3G4, que comprenda un agente de diagnóstico unido funcionalmente al agente de unión al tumor o anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, o anticuerpo a base de 3G4, formando por ello una imagen detectable del tumor; y

(b) administrando posteriormente, al mismo animal o paciente, una cantidad terapéuticamente optimizada de al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, desnudo, o anticuerpo 3G4 o construcción de anticuerpo-agente terapéutico, usando ese anticuerpo y causando con ello un efecto antitumoral.

Por lo tanto se proporcionan formulaciones o medicamentos para la formación de imágenes y para el tratamiento, que comprenden en general:

(a) una primera composición farmacéutica que comprende una cantidad diagnósticamente eficaz de un agente de unión a tumores, detectablemente marcado, preferentemente un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico o una construcción de anticuerpo a base de 3G4, que comprende un agente detectable unido funcionalmente al agente de unión al tumor o anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico o anticuerpo a base de 3G4; y

(b) una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, desnudo, o anticuerpo 3G4, o construcción de anticuerpo- agente terapéutico, usando ese anticuerpo.

Tratamiento de Infecciones Virales: Los desarrollos particularmente importantes y sorprendentes, de la invención, conciernen a composiciones, combinaciones, kits, métodos, usos y medicamentos para el tratamiento o prevención de infecciones virales. Los métodos de tratamiento antivirales, de la invención, conciernen a la administración o uso de cualquiera o más de los agentes terapéuticos anteriores y adicionales, de la invención.

En primera instancia, las composiciones y método de tratamiento, antivirales, de la invención, conciernen a la administración o uso de al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, purificado, o un fragmento de unión al antígeno, del mismo, opcionalmente uno que se enlace al mismo epítope como el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545), o un derivado de péptido de unión a la FE, sustancialmente impermeable a la célula, preferentemente un derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula, como se describió anteriormente en términos de las composiciones y en términos del tratamiento de cáncer. De los derivados de péptidos de unión a la PE, sustancialmente impermeables a la célula, aquellos preferidos para el uso serán los derivados de duramicina sustancialmente impermeables a la célula, tales como la duramicina unida a la biotina o la duramicina unida a la HIgG.

Dado la sorprendente conexión entre los anticuerpos y péptidos de la invención y las infecciones virales, la invención proporciona además una gama de nuevos agentes terapéuticos para el uso en el tratamiento de infecciones virales. En particular la invención proporciona un anticuerpo para un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, particularmente FS y FE, funcionalmente enlazado a al menos un primer agente antiviral. La invención proporciona además un derivado de péptido de unión a la FE, sustancialmente impermeable a la célula, preferentemente un derivado de péptido de duramicina, enlazado funcionalmente a al menos un primer agente antiviral. Los agentes antivirales apropiados para la unión a los anticuerpos y péptidos de la invención incluyen aquellos presentados en la Tabla G.

Por lo tanto, en general, las composiciones antivirales y métodos de tratamiento de la invención conciernen a la administración a un animal o paciente con una infección viral, de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un primer anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, purificado, o un fragmento de unión al antígeno o inmunoconjugado antiviral, del mismo, opcionalmente uno que se enlace esencialmente al mismo epítope como el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545), o un derivado de péptido de unión a la FE, sustancialmente impermeable a la célula, preferentemente un derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula, o un inmunoconjugado antiviral del mismo.

Los métodos y usos de tratamiento antiviral, de la invención, son apropiados para el tratamiento de todos los virus en animales y pacientes, e inclusive en plantas. Los agentes terapéuticos de la invención pueden inhibir la entrada viral, pero preferentemente inhiben la replicación viral, el egreso y diseminación de células huésped infectadas. La invención es apropiada para el tratamiento de todos los virus que infectan a los vertebrados, como se lista en la presente memoria en la Tabla H, particularmente humanos, y particularmente virus que son patógenos en los humanos. Las infecciones virales y enfermedades asociadas que pueden ser tratadas mediante la invención incluyen aquellos virus y enfermedades presentadas en la Tabla J, ilustradas para el tratamiento de infecciones por CMV, RSV y arenavirus, y también hepatitis, gripe, neumonía, fiebre de Lassa y SIDA.

Las composiciones y métodos para el tratamiento antiviral, de la invención, pueden ser usadas también en combinación con otros productos terapéuticos y de diagnóstico. Estos usos "combinados" se combinan con agentes antivirales separados en composiciones combinadas, productos farmacéuticos, cócteles, kits y métodos de tratamiento.

Los métodos y usos anteriores para el tratamiento del cáncer y antivirales, a menudo implican la administración de la composición farmacéuticamente eficaz al animal o paciente sistémicamente, tal como mediante inyección transdérmica, intramuscular, intravenosa, y similar. Para el tratamiento de infecciones virales, particularmente infecciones virales respiratorias, se prefiere el suministro al pulmón, lo cual puede conseguirse usando un aerosol. Sin embargo, cualquier vía de administración que permita al agente terapéutico localizar el tumor o sitio de la infección será aceptable. Por lo tanto otras vías de administración apropiadas incluyen la oral, rectal, nasal, tópica y vaginal. Para usos y métodos para el tratamiento de artritis, por ejemplo, se puede emplear la administración intrasinovial, como se describe para otros agentes inmunológicos en la patente US 5.753.230 incorporada específicamente en la presente como referencia. Para afecciones relacionadas con los ojos, se contemplan las formulaciones y administración oftálmica.

"Administración", tal como se usa en la presente memoria significa la provisión o administración del anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico o productos terapéuticos a base de 3G4, o derivado de péptido de unión a la PE, sustancialmente impermeable a la célula, preferentemente derivados de duramicina en una(s) cantidad(es) y por un periodo eficaz para ejercer un efecto terapéutico. Se prefiere generalmente la administración pasiva de productos terapéuticos proteicos, en parte, por su simplicidad y reproducibilidad.

Sin embargo, el término "administración" se usa en la presente memoria para referirse a cualquiera y todos los medios mediante los cuales se suministren los productos terapéuticos. Por lo tanto "administración" incluye la provisión de células que produzcan el anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, productos terapéuticos derivados de duramicina o a base de 3G4, en una manera eficaz. En esas realizaciones puede desearse formular o empacar las células según la membrana selectivamente permeable, estructura o dispositivo implantable, generalmente uno que pueda retirarse para detener la terapia. La administración exógena seguirá siendo generalmente la preferida, ya que esta representa un método no invasivo que permite monitorizar y controlar estrechamente la dosis.

Los métodos y usos terapéuticos de la invención se extienden también a la provisión de ácidos nucleicos que codifiquen el anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, productos terapéuticos derivados de duramicina o a base de 3G4 en una manera eficaz para que dé por resultado su expresión *in vivo*. Se puede emplear cualquier técnica de terapia genética tal como el suministro de ADN desnudo, genes recombinantes y vectores, el suministro basado en células, incluyendo, la manipulación ex vivo de células de paciente, y similares. Los liposomas y liposomas furtivos se preferirán para el uso en algunas realizaciones.

Las composiciones farmacéuticas y métodos del tratamiento de la invención emplean "cantidades terapéuticamente eficaces" de un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, opcionalmente uno que se enlace a sustancialmente el mismo epítope como el anticuerpo monoclonal 3G4 (ATCC PTA 4545), o un fragmento de unión al antígeno o inmunoconjugado de ese anticuerpo, o un derivado de péptido de unión a la FE, sustancialmente

impermeable a la célula, preferentemente un derivado de duramicina sustancialmente impermeable a la célula. Los "efectos terapéuticos" y consecuentemente las "cantidades terapéuticamente eficaces" se miden a través de parámetros diferentes en el tratamiento contra el cáncer frente al tratamiento antiviral.

En el tratamiento del cáncer, las cantidades de los agentes son eficaces para eliminar específicamente al menos una porción de las células tumorales, células endoteliales vasculares tumorales o intratumorales; para inducir específicamente la apoptosis en al menos una parte de las células tumorales, de las células endoteliales vasculares tumorales o intratumorales; para promover específicamente la coagulación en al menos una porción de los vasos sanguíneos tumorales o intratumorales; para ocluir específicamente o destruir al menos una porción de los vasos que transportan sangre del tumor; para inducir específicamente la necrosis en al menos una porción de un tumor; y/o para inducir la regresión o remisión del tumor con la administración a un animal o a un paciente.

En el tratamiento de infecciones virales y enfermedades relacionadas, las cantidades de los agentes son eficaces para inhibir uno o más requerimientos para la infección viral en curso, tal como la entrada viral, y preferentemente en la replicación viral, el egreso y diseminación de las células huésped infectadas. Las cantidades pueden eliminar o retirar al menos una parte de las células viralmente infectadas en una manera que contrarreste la replicación viral, la diseminación y la infección en curso. En general las cantidades de los agentes son eficaces para reducir, significativamente o erradicar, la infección viral, con la administración a un animal o paciente.

Los términos "preferencialmente" y "específicamente", tal como se usan en la presente memoria, significa que el anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, los productos terapéuticos a base de 3G4, o los derivados de péptidos de unión a la FE, sustancialmente impermeables a la célula, preferentemente derivado de duramicina, consiguen efectos anticancerosos o antivirales que se confinan sustancialmente en el sitio de la enfermedad, y sustancialmente no causan coagulación, destrucción y/o necrosis del tejido en los tejidos normales, saludables, del animal o sujeto. La estructura y función de las células y tejidos saludables se mantienen entonces sustancialmente sin daños a través de la práctica de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la descripción y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la invención. La invención puede comprenderse mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en esta memoria. El archivo de Estados Unidos de Norteamérica de esta patente contiene al menos un dibujo a color. Copias de esta patente con el(los) dibujo(s) a color serán proporcionadas por la Oficina de Patentes y Marcas al ser solicitado(s) y al pagar los derechos necesarios.

Figura 1. Localización del anticuerpo anti-FS (3SB) en células endoteliales vasculares en el linfoma de Hodgkin humano L540, carcinoma de pulmón murino 3LL y tumores de melanoma de murino B16, en ratones. Ratones SCID que contenían tumores recibieron una inyección intravenosa de 20 µg de IgM de ratón anti-FS (3SB) o anti-CL (D11). La circulación sanguínea se perfundió con solución salina una hora después. Los ratones se sacrificaron una hora después y el tumor y los órganos se extrajeron y se congelaron. La IgM de ratón se detectó en las secciones congeladas usando conjugado de IgM-peroxidasa antiratón de cabra. El anticuerpo anti-FS se encontró localizado específicamente en los vasos sanguíneos (indicado mediante flechas) en todos los tumores. No se observó localización en ratones inyectados con el control, IgM anti-CL.

Figura 2A y figura 2B. Unión del anticuerpo 9D2 y anexina V a fosfolípidos absorbidos en plástico. Los fosfolípidos fueron absorbidos en el plástico de placas de microtitulación. Después del bloqueo con 10% de suero, se añadieron el anticuerpo 9D2 (figura 2A) o anexina V (figura 2B) a concentraciones que variaban de 6,66 nM a 0,005 nM en presencia de 10% de suero. Las placas fueron lavadas y el anticuerpo 9D2 unido y la anexina V fueron detectados usando IgM-HRP antirata de cabra e IgG anti-anexina V de conejo seguido de HRP anticonejo, respectivamente.

Figura 3. Inhibición de la unión del anticuerpo 9D2 y anexina V a fosfolípidos aniónicos en células endoteliales tratadas con H_2O_2 con liposomas fosfolipídicos competidores. El anticuerpo 9D2 y la anexina V (6.66 nM) fueron preincubados con varios liposomas fosfolípidos (200 µg/ml) solución tampón DPBS que contenía 10% de suero. El anticuerpo 9D2 enlazado y la anexina V fueron detectados usando IgM-HRP antirata de cabra e IgG antianexina V de conejo, seguido por HRP anticonejo, respectivamente. Se determinó la unión en presencia o en ausencia de liposomas competidores. Las desviaciones típicas de mediciones por triplicado fueron menores de 10% de los valores promedio.

Figura 4. Localización del anticuerpo 9D2 marcado con biotina y anexina V a células endoteliales vasculares y células tumorales en tumores de mama humanos MDA-MB-231 ortotópicos, en ratones. Ratones nu/nu que tenían tumores MDA-MB-231 en sus panículos adiposos mamarios, recibieron una inyección intravenosa de 50 µg de anticuerpo 9D2 marcado con biotina o 100 µg de anexina V marcada con biotina. Una hora después se perfundió su circulación sanguínea con solución salina. Los tumores y órganos se extrajeron y se congelaron a presión. El 9D2 y anexina V localizados fueron detectados sobre las secciones congeladas usando conjugado de

estreptavidina-HRP. Las secciones de tumor derivadas de ratones inyectados con solución salina o el control de IgM de rata, sirvieron como controles negativos.

Figura 5. Efectos combinados de la hipoxia y citocinas inflamatorias en la exposición a FS. Se trataron células bEnd.3 durante 24 horas con IL-1a y TNFα en condiciones normóxicas (barras blancas) hipoxia (barras grises). Las monocapas de células permanecieron intactas y viables en estas condiciones. La externalización de la FS fue determinada midiendo la unión de la ^{125}I-anexina V. El nivel de exposición a la FS fue expresado como un porcentaje de ese valor en células tratadas con una combinación de actinomicina D y TNFα.

Figura 6A y figura 6B. Efectos antitumorales del anticuerpo anti-FS (3SB) en animales con tumores singénicos y xenogénicos. Se inyectaron 1 x 10^7 células de carcinoma colorrectal de murino Colo 26 (figura 6A) o linfoma de Hodgkin humano L540 (figura 6B) por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones BALB/c (figura 6A) o ratones SCID CB17 machos (figura 6B), respectivamente. Se dejó crecer a los tumores hasta alcanzar un tamaño de aproximadamente 0,6 a 0,9 cm^3 y después los ratones (4 animales por grupo) recibieron una inyección intraperitoneal de 20 µg de anticuerpo anti-FS desnudo (cuadros blancos) o solución salina (círculos blancos). El tratamiento se repitió 3 veces con un intervalo de 48 horas. Los animales se monitorizaron diariamente para realizar mediciones de los tumores y del peso corporal. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron 2 cm^3, o antes si los tumores mostraban signos de necrosis o ulceración. La IgM de ratón, de control, proporcionó resultados similares a la solución salina.

Figura 7. Efectos antitumorales del anticuerpo 9D2 en ratones que poseían linfoma de Hodgkin humano L540. Grupos de ratones que tenían tumores recibieron una inyección de 100 µg del anticuerpo 9D2 (círculos negros) por vía intraperitoneal 3 veces por semana, en lugar del control (cuadros blancos). El tamaño del tumor se midió mediante calibradores dos veces por semana. El volumen del tumor se representó gráficamente contra el número de días después de las inyecciones de las células tumorales. Los números entre paréntesis indican el número de ratones con tumores en regresión/número total de ratones por grupo.

Figura 8A, figura 8B, figura 8C, figura 8D, figura 8E, figura 8F y figura 8G. Efectos antitumorales del anticuerpo anti-FS, 3G4, en animales con tumores singénicos y xenogénicos. Células de tumores Meth A de murino (figura 8A), de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (figura 8B y figura 8E), linfoma de Hodgkin humano L540 (figura 8C y figura 8D) y de cáncer MDA-MB-231 (figura 8F y figura 8G) fueron inyectadas a ratones. Los tumores se dejaron crecer hasta los tamaños mostrados antes del tratamiento. Las células de linfoma de Hodgkin humano se dejaron para que formaran tumores grandes. Cada grupo de ratones fue inyectado por vía intraperitoneal 3 veces por semana con 100 µg de anticuerpos 3G4 en vez que con el control (3G4 se menciona en la figura 8A, figura 8B, figura 8C; y se muestra mediante círculos abiertos en la figura 8D, figura 8E, figura 8f). Los animales se monitorizaron dos veces por semana para realizar mediciones de los tumores. El volumen de los tumores se representó gráficamente contra el número de días después de la inoculación de los tumores (figura 8A) o contra los días de tratamiento (figura 8B y figura 8C por un tiempo de 20 a 30 días (figura 8A, figura 8B y figura 8C); los números entre paréntesis indican el número de ratones con tumores en regresión/número total de ratones por grupo) o 60 días (figura 8D, figura 8E y figura 8F). El anticuerpo 3G4 y el anticuerpo 3G4 quimérico (ch3G4) fueron usados para tratar células de cáncer MDA-MB-231, en vez que el control (figura 8G).

Figura 9A y figura 9B. Inhibición de la replicación del CMV *in vitro* mediante el anticuerpo 3G4. Células HHR- R2 infectadas con CMV fueron tratadas con 3G4 (dos paneles de arriba). Los pocillos del control se dejaron sin tratar (dos paneles de abajo) o fueron tratados con el control igualado al isotipo, anticuerpo de IgG_3 GV39G (dos paneles centrales). Las células se observaron en diferentes puntos temporales: el día 3 (columna izquierda) y el día 9 (columna derecha). Las células infectadas aparecieron de color verde al microscopio de fluorescencia. El tratamiento con el anticuerpo a 100 µg/ml (figura 9A) y 50 µg/ml (figura 9B).

Figura 10. Inhibición dependiente de la concentración de la replicación del CMV *in vitro*. Células HHF-R2 infectadas con CMV fueron tratadas con diferentes concentraciones de 3G4 (paneles de arriba). Los pocillos de control fueron dejados sin tratar (panel de abajo) o fueron tratados con el anticuerpo IgG3 de control igualado al isotipo GV39G (paneles intermedios). Las células se observaron el día 9. Las células infectadas aparecieron de color verde al microscopio de fluorescencia.

Figura 11A, figura 11B y figura 11C. Cuantificación de la carga viral de CMV en células tratadas con anticuerpo e inhibición de la replicación en una etapa tardía del ciclo de replicación viral. Monocapas de fibroblastos humanos fueron infectadas con CMV a una m.o.i. baja de 0.01 ufp/célula y se trataron con las concentraciones indicadas del anticuerpo 3G4; el anticuerpo de control, GV39G; o el anticuerpo de control anticolchicina, C44 (figura 11A; sin tratar, control no tratado). Monocapas de fibroblastos humanos fueron infectadas con CMV a una m.o.i. alta de 3 ufp/célula y se trataron con 50 µg/ml o 100 µg/ml del anticuerpo 3G4 o el anticuerpo de control, GV39G (figura 11B). Monocapas de fibroblastos humanos fueron infectadas con CMV a una m.o.i. alta, el anticuerpo 3G4 o el anticuerpo de control, GV39G fueron añadidos en los puntos temporales indicados después de la infección (figura 11C). Tanto en la figura 11A, figura 11B como en la figura 11C, se cuantificó la carga viral en células y en los sobrenadantes, usando un ensayo en placa estándar.

Figura 12. Inhibición de la replicación del RSV *in vitro* por los anticuerpos 3G4, 1B9 y 3SB. Las células A-549 infectadas con RSV fueron tratadas con 3G4, 1B9 o 3SB o se dejaron sin tratar como control. El tratamiento con 1B9 (verde) y 3SB (rojo) dio por resultado una reducción logarítmica de la replicación viral (frente al control azul). El efecto antiviral inclusive más pronunciado del 3G4, se muestra en color rosado.

Figura 13A, figura 13B, figura 13C, figura 13D, figura 13E, figura 13F, figura 13G, figura 13H, figura 13I, figura 13J, figura 13K, figura 13L, figura 13M, figura 13N, figura 13O, figura 13P, figura 13Q y figura 13R. Estructuras de derivados de duramicina. Se representan las estructuras químicas para los derivados de duramicina ejemplares, del ejemplo XV. En cada uno de los compuestos de la figura 13A a la figura 13O, el péptido de unión a la FE, la duramicina, ha sido unida a un grupo impermeable a la célula para prevenir que el construcción ejerza efectos tóxicos no específicos, significativos. La estructura esquemática del péptido cíclico duramicina parental relacionado, se muestra en la figura 13P. La secuencia lineal está representada por la SEC ID NO: 9, y las estructuras de los aminoácidos modificados en las secuencias se representan en la figura 13Q. La figura 13R representa una construcción antiviral de duramicina, ejemplar, en el que la duramicina se encuentra unida al cidofovir.

Figura 14A, figura 14B, figura 14C y figura 14D. Especificidades de unión de los derivados de duramicina. Los derivados de duramicina fueron preparados como se describió en el ejemplo XV y sus especificidades se determinaron usando ensayos ELISA y ELISA de competencia, como se describió en el ejemplo XVI. La figura 14A muestra el perfil de unión al fosfolípido de los derivados de duramicina, contra un panel de fosfolípidos, muestra especificidad por la PE. En la figura 14B, el suero no tiene efectos significativos en la unión a la PE; figura 14C y figura 14D muestra el resultado de los ELISA de competencia que confirman la especificidad de los derivados de duramicina por la PE.

Figura 15. Inhibición de la replicación del CMV *in vitro* por los derivados de duramicina. Células HHF-R2 infectadas con CMV fueron tratadas con derivados de duramicina $(DLB)_4NA$ y $(DIM)_nHIgG$. Los pocillos de control se dejaron sin tratar. Las células fueron observadas en diferentes puntos temporales: día 4 (paneles izquierdos) y día 6 (paneles derechos). Las células infectadas aparecen de color verde al microscopio de fluorescencia. El $(DLB)_4NA$ y $(DIM)_nHIgG$ inhiben la diseminación viral a partir de células infectadas individualmente.

Figura 16. Inhibición selectiva de la división de células endoteliales por anticuerpos anti-FS. Los anticuerpos anti-FS 3SB, 9D2 y 3G4 fueron analizados con respecto a los efectos inhibidores en células endoteliales *in vitro* como en el ejemplo XVIII. Cada uno de los anticuerpos 3SB, 9D2 y 3G4 exhiben una inhibición selectiva de la división de las células endoteliales (subconfluentes) en vez que células inactivas (confluentes). Los anticuerpos 9D2 y 3G4 tienen ambos un mayor efecto inhibidor que el 3SB.

Figura 17A y figura 17B. Efectos antiangiogénicos y de direccionamiento vascular del anticuerpo 3G4 en ratones con tumores. Ratones desnudos que tenían tumores ortotópicos MDA-MB-231 fueron tratados 3 veces por semana con 100 µg/dosis de anticuerpo 3G4 (tratado, paneles derechos) o con la misma dosis de un anticuerpo de control igualado al isotipo (control, paneles de la izquierda). Al concluir el tratamiento los animales fueron perfundidos y los tumores fueron congelados, cortados y teñidos con un anticuerpo para el CD31 de murino (CD31 antiratón, de rata), un marcador panendotelial de la vasculatura de murino (figura 17A), o incluidos en parafina y sometidos a tensión con HYE (figura 17B). Al comparar las secciones de tumor de los animales de control y tratados se observa que la administración del 3G4 da por resultado efectos antiangiogénicos (figura 17A) y de direccionamiento vascular (figura 17B).

Figura 18A y figura 18B. ADN y secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo 3G4. Se presentan las secuencias de ADN y de aminoácidos para las cadenas pesada (figura 18A; SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2) y ligera (figura 18B; SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4), y se muestran los sitios de restricción en las secuencias de ADN. La secuencia líder se distingue de la proteína madura, la cual empieza como lo muestra la primer flecha tanto en la figura 18A como en la figura 18B. Se presentan medios ejemplares para injertar cada secuencia variable con una región constante humana, en donde la primera parte de las secuencias de región constante humanas, respectivas (SEC ID NO: 7 y SEC ID NO: 8) son mostradas por la segunda flecha tanto en la figura 18A como en la figura 18B.

Figura 19A y figura 19B. Comparación de la unión a la FS, del anticuerpo anti-FS de IgG, 3G4, con el anticuerpo anti-FS de IgM, 3SB. La unión a la FS del anticuerpo de IgM, 3SB (♦) y dos anticuerpos de IgG, 3G4(A) y 3B10 (■), fue determinado mediante ELISA usando concentraciones de anticuerpos de hasta 3.375 nM (figura 19A). La unión a la FS de los anticuerpos 3SB (♦), 3G4 (A) y 3B10 (■) a concentraciones de hasta 0.06 nM se muestra en forma separada (figura 19B).

Figura 20. Inhibición de la unión del anticuerpo 3G4 a FS inmovilizado, usando liposomas fosfolípidos competidores. El anticuerpo 3G4 (0,1 µg/ml) se preincubó durante 30 minutos con varios liposomas producidos a partir de fosfolípidos puros (FS-L, FE-L, FI-L, FC-L, CL-L, AF-L y FG -L) o solución tampón sola (control). Las mezclas se añadieron después a placas para ELISA recubiertas con FS, se lavaron y se detectaron los anticuerpos

enlazados usando anticuerpos secundarios y OPD. La unión en presencia de los liposomas listados se muestra y compara con unión del anticuerpo 3G4 en la ausencia de liposomas.

Figura 21. Unión del 3G4 quimérico a fosfolípidoS. El anticuerpo 3G4 quimérico (ch3G4) fue preparado como se describe en el ejemplo XIX. Los fosfolípidos (FS, FI, FE, FC, EM, CL, FG y AF) fueron adsorbidos al plástico de placas de microtitulación. Después del bloqueo, se añadió el anticuerpo 3G4 quimérico a las concentraciones mostradas. Las placas fueron lavadas y el anticuerpo quimérico 3G4 unido se detectó a través de la unión del anticuerpo secundario y el desarrollo.

Figura 22. Localización del 3G4 quimérico para el endotelio vascular de tumores, *in vivo*. Ch3G4 marcado con biotina (paneles de arriba) e IgG de control (paneles de abajo) fueron administrados a ratones que tenían tumores MD- MBA-435s. Las secciones del tumor se tiñeron con Cy3-estreptavidina conjugada para detectar los anticuerpos marcados con biotina (paneles de la izquierda). La tinción con el anticuerpo MECA 32 seguido por el anticuerpo secundario IgG antirata marcado con FITC, se llevó a cabo para detectar el endotelio vascular (paneles intermedios). Surgieron las imágenes rojas y verdes (paneles derechos), con lo cual las proteínas marcadas con biotina, unidas al endotelio vascular de los tumores, aparecieron amarillas. La tinción coincidente del anticuerpo 3G4 localizado y del marcador MECA 32 del endotelio vascular, se muestra mediante el color amarillo sobre las imágenes superpuestas (parte derecha superior).

Figura 23. Incremento de la fagocitosis de macrófagos de células positivas a la FS por el 3G4. Células de tumores HL-60 fueron marcadas con el colorante fluorescente verde CFDA, y la exposición a la FS fue inducida por 200 μM de H_2O_2. Las células tratadas se recogieron y se opsonizaron durante 1 hora usando 5 μg/ml de 3G4 o un anticuerpo de control igualado al isotipo (BBG3). Las células diana se añadieron después a los macrófagos, los cuales fueron aislados de la médula ósea de ratón y cultivados en portaobjetos de cámara durante 5 días en medios que contenían 5 μg/ml de GM-CSF. Después de 2 horas, los portaobjetos se fijaron y la fagocitosis se contó visualmente al microscopio de fluorescencia. Los resultados se presentan como el porcentaje de los macrófagos que exhibieron fagocitosis (macrófagos que habían llevado a cabo la fagocitosis al menos en una célula de tumor).

Figura 24A y figura 24B. Inducción de la exposición a la FS en células endoteliales por el docetaxel. Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y células endoteliales de microvasos humanas (HMVEC) fueron tratadas con 10 nM de docetaxel durante 24 horas. Las células se recogieron, se lavaron con PBS y se incubaron con 3G4 a razón de 10 μg/ml durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron después dos veces, se añadió IgG antiratón de cabra, marcada con FITC, y las células se incubaron durante 30 minutos más en hielo. Las células se lavaron y se analizaron después mediante FACS usando un citómetro FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA) con software de adquisición de CellQuest. Tanto la HUVEC (figura 24A) como la HMVEC (figura 24B), tratadas, muestran incrementos significativos en la unión del 3G4, en comparación con células no tratadas.

Figura 25A, figura 25B y figura 25C. Inducción de la exposición de la FS en líneas celulares de tumores por docetaxel. Células de carcinoma de pulmón de Lewis de ratón 3LL, de carcinoma de colon de ratón Colo26 y de cáncer de mama humano MDA-MB-435 fueron tratadas con 10 nM de docetaxel durante 24 horas. Las células se recogieron, se lavaron con PBS y se incubaron con 3G4 a razón de 10 μg/ml durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron después dos veces, y se añadió IgG antiratón de cabra marcado con FITC y las células se incubaron durante 30 minutos más en hielo. Las células se lavaron y se analizaron después mediante FACS usando un citómetro FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA) con el software de adquisición de Cell-Quest. Las células 3LL (figura 25A), Colo26 (figura 25B) y MDA-MB-435, (figura 25c), tratadas, muestran incrementos significativos en la unión del 3G4, en comparación con las células no tratadas.

Figura 26. Inducción de la exposición a la FS en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 por el docetaxel. Células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 fueron tratadas con 10 nM de docetaxel durante 24 horas. Las células se recogieron, se lavaron con PBS y se incubaron con 3G4 quimérico (ch3G4) o de control, IgG humano durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron después dos veces, se añadió anti-IgG marcado con FITC y las células se analizaron mediante FACS, como se ha indicado anteriormente. Existe un incremento significativo en la unión del ch3G4 en comparación con el control, IgG humano.

Figura 27. El tratamiento con anticuerpos anti-FS incrementa la supervivencia de ratones infectados con mCMV. Ratones Balb/C fueron infectados con mCMV y tratados con 3G4 o ch3G4, como se describe en el ejemplo XXI. La supervivencia de los ratones se controló después de 90 días de la infección.

Figura 28. El tratamiento con el derivado de duramicina-biotina, DLB incrementa la supervivencia de ratones infectados con mCMV. Ratones Balb/C fueron infectados con mCMV y tratados con DLB como se describe en el ejemplo XXII. La supervivencia de los ratones se controló después de 90 días de la infección.

Figura 29A y figura 29B. Unión de 3G4 quimérico a células infectadas con el virus de la vacuna. Células U937 fueron infectadas con el virus de la vacuna y teñidas con el anticuerpo 3G4 quimérico (ch3G4) o IgG humano de control (HIgG) el día 2 después de la infección. Figura 29A, células U-937 no infectadas. Figura 29B, células U937 infectadas con el virus de la vacuna. Los picos en la figura 29A y la figura 29B son: pico izquierdo (rojo), anticuerpo secundario solo de control; pico intermedio (azul), HIgG de control; pico derecho (verde), ch3G4.

Figura 30A, figura 30B, figura 30C y figura 30D. Inhibición de la replicación del virus Pichinde *in vitro* por el anticuerpo 3G4. Células Vero fueron infectadas con virus Pichinde a una m.o.i. de 0.01 ufp/célula. Las células infectadas fueron tratadas con 100 µg/ml de 3G4 (figura 30A) o con anticuerpo de control igualado al isotipo, GV39G (figura 30B). El día 2 después de la infección las células fueron recolectadas con tripsina y se le dejó adherirse a los portaobjetos. Las células fueron fijadas con acetona, y teñidas con suero policlonal de conejo anti-PIC seguido de anticuerpo secundario conjugado con biotina anticonejo de cabra. Las células infectadas se tiñen de color rojo-café. El anticuerpo secundario solo no produjo tinción (figura 30C). También se muestra el % de células infectadas en el 3G4 contra las células tratadas de control (figura 30D).

Figura 31. El conjugado de duramicina-IgG humana (HIgG) inhibe el crecimiento del tumor MethA *in vivo*. Ratones BALB/c que tenían células del tumor MethA fueron tratadas con el conjugado de duramicina-HIgG $(D\text{-}SIAB)_nHIgG$, en el cual la duramicina se encuentra conjugada a la HIgG usando el enlazador SIAB o con HIgG de control como se describe en el ejemplo XXV.

Figura 32. El conjugado de duramicina no es citotóxico. El compuesto duramicina natural y la construcción de duramicina marcada con biotina, DLB fueron analizados con respecto a sus efectos citotóxicos en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) usando un ensayo MTT.

Figura 33. El conjugado de duramicina-anticuerpo incrementa la fagocitosis de los macrófagos, de células apoptópicas. Se construyó un conjugado de duramicina-anticuerpo uniendo la duramicina al C44, un anticuerpo IgG_{2a} de ratón, para crear duramicina-C44 (DuC44). Células HL-60 apoptópicas fueron incubadas con macrófagos derivados de la médula ósea de ratón en presencia de DuC44, a un anticuerpo de ratón de control, BBG3 y el anticuerpo 3G4. La fagocitosis fue evaluada como el porcentaje de fagocitos positivo por captación. Los datos son valores promedio ± E.T.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

Los tumores sólidos y carcinomas presentan más del 90% de los canceres en el hombre. Aunque el uso de anticuerpos monoclonales e inmunotoxinas ha sido investigado en la terapia de linfomas y leucemias (Vitettaa *et al.*, 1991), estos agentes han sido desagradablemente ineficaces en ensayos clínicos contra carcinomas y otros tumores sólidos (Abrams y Oldham, 1985). Una razón principal para la inefectividad de los tratamientos basados en anticuerpos, es que las macromoléculas no son transportadas fácilmente hacia los tumores sólidos. Inclusive una vez adentro de una masa tumoral estas moléculas fallan en distribuirse uniformemente debido a la presencia de uniones estrechas entre las células tumorales, estroma fibroso, gradientes de presión intersticial y barreras del sitio de unión (Denekamp, 1990; Dvorak *et al.*, 1991).

Al desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de tumores sólidos, los métodos que involucran dirigirse a la vasculatura del tumor, en vez que a las células del tumor, ofrecen distintas ventajas. Una destrucción o bloqueo eficaz de los vasos del tumor resta el flujo sanguíneo a través del tumor, dando por resultado una avalancha de la muerte de las células del tumor. Las construcciones de anticuerpo-toxina y anticuerpo-coagulante, ejemplos de ADV que destruyen y/u ocluyen selectivamente los vasos sanguíneos de los tumores, han sido usados ya para producir un gran efecto en la localización específica y destrucción de la vasculatura del tumor, dando por resultado la necrosis del tumor (Burrows *et al.*, 1992; Burrows y Thorpe, 1993; WO 93/17715; WO 96/01653; Huang *et al.*, 1997).

Los ADV ejercen su acción primaria en los vasos sanguíneos preexistentes de los tumores sólidos, y difieren de los agentes antiangiogénicos en que previenen la nueva formación de vasos sanguíneos. Existen numerosas ventajas del ADV sobre otras terapias contra el cáncer. Primero, un solo vaso proporciona la nutrición y facilita la remoción de los productos de desecho del metabolismo, de centenares o millares de células tumorales, y sólo tiene que ser dañado en un punto para bloquear el flujo sanguíneo aguas arriba y aguas abajo. Los ADV son entonces particularmente eficaces en tumores establecidos. Segundo, la aniquilación de células endoteliales, aunque es un mecanismo útil no se requiere. Un cambio de la forma o inicio local de la coagulación de la sangre puede ser suficiente. Tercero, la célula endotelial se encuentra adyacente al torrente sanguíneo, asegurando un suministro adecuado del fármaco. Cuarto, el objetivo es una célula diploide normal que es improbable que adquiera mutaciones genéticas para volverse resistente al fármaco. Quinto, un marcador sustitutivo de la actividad biológica, es decir, del flujo sanguíneo, es medible.

Sexto, los efectos temporales en la función vascular pueden ser suficientes para representar efectos antitumorales significativos. Los estudios indican que más del 99% de las células tumorales *in vivo* pueden ser exterminadas durante un período de dos horas de isquemia. Finalmente, a diferencia de los inhibidores de la angiogénesis, los ADV requieren sólo de la administración intermitente para entrar en sinergia con los tratamientos convencionales, en vez que una administración crónica durante meses o años.

En las siguientes patentes de Estados Unidos 5,660,827, 5,776,427, 5,855,866, 5,863,538, 5,965,132, 6,004,554, 6,051,230, 6,261,535 y 6,451,312, se describen ADV citotóxicos. Cuando se usan anticuerpos, factores de crecimiento u otros ligandos de unión, para suministrar específicamente un coagulante a la vasculatura del tumor, dichos agentes

se denominan "coaguligandos". Los ADV de coaguligandos se describen en las siguientes patentes: patentes US Nos 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289 y 6.036.955.

Un coagulante actualmente preferido para el uso en coaguligandos es el Factor Tisular Truncado (tTF) (Huang *et al.*, 1997; WO 96/01653; patente US 5.877.289). El TF es el principal iniciador de la coagulación de la sangre (Ruf *et al.*, 1991; Edgington *et al.*, 1991). En sitios de lesión, el factor VII/VIIa en la sangre entra en contacto con y se une a TF que se encuentra sobre las células en los tejidos perivasculares. El complejo TF:VIIa en presencia de la superficie del fosfolípido, activa los factores IX y X. Esto a su vez conduce a la formación de trombina y fibrina y finalmente a un coagulo de sangre (Ruf y Edgington, 1994).
La forma recombinante, truncada, del factor tisular (tTF), que carece de los dominios citosólico y transmembrana, es una proteína soluble que tiene aproximadamente cinco ordenes de magnitud menor en la capacidad para inducir coagulación, en comparación con el TF nativo (Stone *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1997). Esto se debe a que el TF necesita ser asociado con fosfolípidos para el complejo con VIIa para activar el IXa o Xa eficientemente. Sin embargo, cuando el tTF es suministrado al endotelio de la vasculatura de tumores mediante un agente o anticuerpo de direccionamiento, se pone nuevamente en proximidad con una superficie lipídica y vuelve a ganar actividad trombogénica (Huang *et al.*, 1997; patentes US Nos 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289 y 6.036.955). De esta manera se crea un coaguligando que selectivamente causa trombosis en la vasculatura del tumor.

El TF truncado tiene varias ventajas que recomiendan su uso en coaguligandos dirigidos a la vasculatura: el tTF humano se encuentra fácilmente disponible, y la proteína humana tendrá una inmunogenicidad baja o despreciable en el hombre; El tTf humano es totalmente funcional en animales experimentales, incluyendo ratones; y el tTF dirigido es muy potente porque desencadena la activación de una cascada de proteínas de coagulación, que proporcionan un efecto en gran medida amplificado (patentes US Nos 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289 y 6.036.955).

Se ha descrito una amplia variedad de moléculas objetivo apropiadas que se encuentran disponibles en el endotelio del tumor, pero que se encuentran en gran medida ausentes del endotelio normal. Por ejemplo se pueden utilizar objetivos expresados, tales como la endoglina, E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1, PSMA, un TIE, un ligando reactivo con LAM-1, un receptor VEGF/FPV, un receptor FGF, $\alpha_v\beta_3$ integrina, pleiotropina o endosialina (patentes US Nos 5.855.866, 5.877.289; Burrows *et al.*, 1992; Burrows y Thorpe, 1993; Huang *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Ohizumi *et al.*, 1997).

Las dianas adsorbidas son otro grupo apropiado, tal como VEGF, FGF, TGFβ, HGF, PF4, PDGF, TIMP, un ligando que se une a una TIE o una isoforma de fibronectina asociada con un tumor (patentes US Nos 5.877.289, 5.965.132, 6.051.230 y 6.004.555). Las isoformas de fibronectina son ligandos que se unen a la familia de receptores de la integrina. Las isoformas de fibronectinas asociadas con tumores son componentes objetivos, tanto de la vasculatura del tumor como del estroma del tumor. El anticuerpo monoclonal BC-1 (C ARN Emolla *et al.*, 1989) se une específicamente a las isoformas de fibronectina asociadas al tumor.

Otras dianas inducibles por el ambiente del tumor natural o después de la intervención del hombre, son aquellas entidades diana, como se describe en las patentes Nos US 5.776.427, 5.863.538, y 6.036.995. Cuando se usa junto con la supresión previa en tejidos normales y la inducción vascular en tumores, los antígenos MHC clase II pueden ser empleados también como dianas (patentes US Nos 5.776.427, 5.863.538, 6.004.554 y 6.036.995).

Una diana actualmente preferida para aplicaciones clínicas es la molécula-1 de adhesión endotelial vascular (VCAM-1) (patentes US Nos 5,855,866, 5,877,289, 6,051,230, 6,004,555 y 6,093,399). La VCAM-1 es una molécula de adhesión celular que es inducida por citocinas inflamatorias IL-1α, IL-4 (Thornhill *et al.*, 1990) y TNFα (Munro, 1993) y cuyo papel *in vivo* es reclutar leucocitos en sitios de inflamación aguda (Bevilacqua, 1993).

La VCAM-1 se encuentra presente en células endoteliales vasculares en cierto número de tumores malignos humanos incluyendo el neuroblastoma (Patey *et al.*, 1996), carcinoma renal (Droz *et al.*, 1994), carcinoma no pequeño de pulmón (Staal-van den Brekel *et al.*, 1996), enfermedad de Hodgkin (Patey *et al.*, 1996), y angiosarcoma (Kuzu et al, 1993), así como en tumores benignos, tales como el angioma (Patey *et al.*, 1996) y hemangioma (Kuzu *et al.*, 1993). La expresión constitutiva de la VCAM-1 en el hombre se encuentra confinada a unos cuantos vasos en la tiroides, timo y riñón (Kuzu *et al.*, 1993; Bruijn y Dinklo, 1993), y en el ratón en los vasos en el corazón y pulmón (Fries *et al.*, 1993).

Ciertos de los datos presentados en la presente memoria complementan incluso en forma adicional aquellos proporcionados en las patentes US Nos 5,855,866, 5,877,289, 6,051,230, 6,004,555 y 6,093,399, y muestran la inducción selectiva de la trombosis y la infartación de tumores que resultan de la administración de un coaguligando anti-VCAM-1•tTF. Los resultados presentados fueron generados usando ratones que tenían linfoma de Hodgkin humano L540. Cuando se hace crecer como un xenoinjerto en ratones SCID, este tumor muestra estrecha similitud con la enfermedad humana con respecto a la expresión de citocinas inflamatorias (Diehl *et al.*, 1985) y la presencia de VCAM-1 y otras moléculas de activación de células endoteliales en su vasculatura.

Usando un coaguligando anti-VCAM-1•tTF unido covalentemente, en el que el tTF fue unido directamente al anticuerpo anti-VCAM-1, en la presente memoria se demuestra que el coaguligando se localiza selectivamente en los vasos del tumor, que induce trombosis en esos vasos, que causa necrosis para desarrollarse en todo el tumor y que

retrasa el crecimiento del tumor en ratones que tienen tumores de Hodgkin L540 sólidos. Los tumores generalmente necesitan tener al menos aproximadamente 0.3 cm de diámetro para responder al coaguligando, porque el VCAM-1 se encontró ausente de tumores más pequeños. Se supone que en tumores pequeños los niveles de citocinas segregados por las células tumorales o células huésped que se infiltran en el tumor, son demasiados bajos para causar la inducción de VCAM-1. Esto concuerda con los estudios de las patentes US Nos 5,855, 866, 5,877,289, 6,051,230, 6,004,555 y 6,093,399, donde las invenciones demostraron ser lo más útiles en tumores sólidos más grandes.

Aunque inicialmente se observó la tinción del VCAM-1, más en la periferia del tumor, el coaguligando se unió evidentemente a los vasos que transportan sangre ocluidos, a la vez que pudo reducir el flujo sanguíneo en todas las regiones del tumor. Además, uno de los inventores contempla que la generación de trombina causada por la administración inicial del coaguligando conduce probablemente a una inducción de VCAM-1 adicional, en los vasos centrales (Sluiter *et al.*, 1993), dando por resultado una señal amplificada y la destrucción evidente de la región intratumoral. Este tipo de expresión inducida por el coagulante de marcadores diana adicionales, y por tanto la amplificación de la señal, se describe también en la patente US No 6.036.955.

Como se muestra en la presente memoria, aunque la localización en los vasos que expresan el VCAM-1 en el corazón y pulmones de los ratones, se observó con la administración de coaguligando anti-VCAM-1, esta construcción no indujo trombosis en esos sitios sin tumor. Además, el coaguligando anti-VCAM-1 no fue más tóxico para los ratones que un coaguligando de control de especificidad irrelevante, indicando nuevamente que la expresión constitutiva del VCAM- 1 en los vasos del corazón y pulmones no condujo a toxicidad. Estos datos son importantes para el progreso clínico inmediato de la terapia con coaguligandos, dado que el VCAM-1 es un marcador natural del endotelio vascular de tumores en humanos. Sin embargo este fenómeno proporcionó también a los inventores un discernimiento único que condujo a un enfoque totalmente diferente para la destrucción de la vasculatura de tumores.

A. Tratamiento de Tumores con Anticuerpos Desnudos para Aminofosfolípidos

Los inventores buscaron comprender el mecanismo que se encontraba detrás de la capacidad del coaguligando anti-VCAM-1 para unirse al VCAM-1 expresado constitutivamente en los vasos sanguíneos en el corazón y pulmones, sin causar trombosis en esos vasos. Existen numerosas posibilidades científicas para esta observación empírica, conectadas generalmente con la naturaleza protrombótica del ambiente del tumor y cualquier predisposición fibrinolítica en el corazón y pulmones.

Generalmente existe un equilibrio biológico entre el sistema de coaguligando (deposición de fibrina) y el sistema fibrinolítico (degradación de la fibrina por enzimas). Sin embargo, en una enfermedad maligna, particularmente carcinomas, este equilibrio se rompe dando por resultado la activación anormal de la coagulación (hipercoagubilidad o el "estado protrombótico"). A pesar de la extensiva investigación, una explicación molecular clara para la naturaleza protrombótica del ambiente del tumor no pudo ser discernida hasta recientemente.

Después de los análisis detallados de muchas posibles opciones, los inventores razonaron que la falla del coaguligando anti-VCAM-1 para causar la trombosis en vasos de tejidos normales se debió a la ausencia del aminofosfolípido, fosfatidilserina (FS) de la superficie luminal de esos vasos. Para completar la teoría, entonces no sólo hubiese tenido que demostrarse que la fosfatidilserina estaba ausente de estos vasos normales, sino que su presencia en el lado luminal de los vasos asociados con el tumor también hubiese tenido que ser demostrada.

Por lo tanto los inventores usaron tinción inmunohistoquímica para evaluar la distribución de un anticuerpo monoclonal antifosfatidilserina (anti-FS), por vía intravenosa, en los ratones que tenían tumores. Estos estudios revelaron que los vasos que expresaban el VCAM-1 en el corazón y pulmones carecían de FS, mientras que los vasos que expresaban el VCAM-1 en el tumor expresaban la FS. La necesidad de la expresión de la FS en la superficie, en la acción del coaguligando, se indica adicionalmente por el descubrimiento de los inventores de que la anexina V, que se une a la FS, bloquea la acción del coaguligando anti-VCAM-1 tTF, tanto *in vitro* como *in vivo*.

La falta del efecto trombótico del coaguligando anti-VCAM-1 en los vasos del corazón y pulmones, normales, fue explicada de esta manera al menos en parte: la ausencia del aminofosfolípido, la fosfatidilserina, significa que los vasos normales carecen de una superficie procoagulante en la cual se pueden ensamblar complejos de coagulación. En la ausencia de la VCAM-1 de la superficie, el anti-VCAM-1tTF se une a los vasos del corazón y pulmones que expresan el VCAM-1, pero no puede inducir trombosis. En cambio, los vasos que expresan el VCAM-1 en el tumor exhiben una expresión coincidente de la FS de la superficie. El coaguligando se une así a los vasos del tumor y activa los factores de coagulación localmente para formar un trombo oclusivo.

Además de delinear los efectos trombóticos específicos al tumor de los coaguligandos anti-VCAM-1, la expresión específica del aminofosfolípido, fosfatidilserina, en la superficie luminal de los vasos sanguíneos del tumor permitió también a los inventores explicar el fenotipo protrombótico observado, pero no comprendido, en estudios previos. La expresión de la FS juega un papel significativo en el estado protrombótico de la vasculatura del tumor.

Siguiendo su descubrimiento de que el aminofosfolípido representativo, fosfatidilserina, era expresado específicamente en la superficie luminal de los vasos sanguíneos del tumor, pero no en los vasos sanguíneos normales, los inventores razonaron que otros aminofosfolípidos tenían potencial como objetivos para la intervención terapéutica. Los inventores desarrollaron entonces métodos de tratamiento y de acción dirigida a la vasculatura del tumor, en base a la acción dirigida hacia los aminofosfolípidos fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (FE).

Un aspecto particularmente sorprendente de los estudios de los inventores fue que la administración de un anticuerpo antiaminofosfolípido, no conjugado, fue eficaz en el tratamiento de tumores. Esto dio lugar a nuevas vías importantes para el tratamiento de tumores usando anticuerpos no conjugados o "desnudos" que se unen a los aminofosfolípidos. Estos métodos de tratamiento y de acción dirigida a la vasculatura del tumor se describen en la patente US 6,406,693, incorporada en la presente memoria como referencia. Aunque los efectos antitumorales en modelos animales aceptados en la técnica, son demostrados en la patente US No 6.406.693, y ampliados en la presente, la capacidad de los aminofosfolípidos para actuar como marcadores objetivos, eficaces y seguros, de la vasculatura del tumor, no podrían haber sido predichos a partir de estudios previos a la patente US No 6.406.693.

Una vez que se demostró el descubrimiento de aminofosfolípidos como marcadores específicos de la vasculatura de tumores, los inventores empezaron a desarrollar una variedad de inmunotoxinas y coaguligandos dirigidos a aminofosfolípidos, para su uso en el tratamiento de tumores. Como se explicó en la patente US No 6.406.693, esto condujo al descubrimiento inesperado de anticuerpos desnudos antiaminofosfolípidos, para el uso en el tratamiento de tumores. En la investigación del potencial aminofosfolípidos objetivos en el contexto de suministrar una toxina o coagulante a la vasculatura del tumor, los inventores en un golpe de suerte encontraron que los anticuerpos anti-FS desnudos tenían un efecto destructor en la vasculatura del tumor *in vivo* en la ausencia de cualquier porción efectora adicional. La capacidad de los anticuerpos aminofosfolípidos tanto para localizar específicamente la vasculatura de tumores como para ejercer un efecto destructor concomitante, que condujo a la necrosis de tumores, fue lo más inesperado.

La presente invención proporciona anticuerpos anti-FS de "segunda generación", sorprendentes y mejorados, entre otras realizaciones, como anticuerpos desnudos en el tratamiento de tumores. Un panel de anticuerpos anti-FS de segunda generación se describe en la presente memoria, de los cuales los anticuerpos monoclonales 9d2 y 3G4 (ATCC 4545) son los preferidos actualmente, junto con la inmunización particular y técnicas de selección para la generación y selección de anticuerpos adicionales con esas propiedades ventajosas. En la presente memoria también se muestra que el daño vascular a los vasos de tumores debido a los anticuerpos anti-FS, es mediado, al menos en parte, por efectores huésped. Estos y otros discernimientos de los inventores de la presente memoria permitieron optimizar el tratamiento con anticuerpos desnudos, tanto como cuando se usan solos como en combinación con otros agentes anticancerosos, tal como se describe en la presente memoria.

B. Tratamiento de Tumores Usando Anticuerpos contra Fosfolípidos Aniónicos

La patente US No 6.406.693 explica que los aminofosfolípidos, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, se segregan normalmente en la superficie interior de la bicapa de la membrana plasmática en diferentes células (Gaffet *et al.*, 1995; Julien *et al.*, 1995) y que esta segregación de lípidos crea una transbicapa asimétrica. Aunque la existencia de la asimetría de la membrana ha sido discutida por algún tiempo, la razón de su existencia y de los mecanismos para su generación y control son poco comprendidos (Williamson y Schlegel, 1994) particularmente en células diferentes a las plaquetas.

Los inventores demostraron previamente que la FS se transloca en la superficie de las células endoteliales vasculares del tumor y esto ocurre, al menos en parte significativa, independientemente de los mecanismos apoptóticos u otros mecanismos de muerte celular (patente US No 6.406.693). De esta manera, la expresión superficial de la FS en el ambiente del tumor no es una consecuencia de la muerte celular y tampoco desencadena la destrucción inmediata de las células. A pesar que la exposición a la FS es detectada regularmente en células endoteliales vasculares, intactas, en varios tumores sólidos, el endotelio vascular de los tumores no es francamente apoptótico, sino que es morfológicamente sano (aunque diferente al de los tejidos normales) y metabólicamente activo. Esto es importante para los métodos terapéuticos basados en las FS objetivas, lo que significa que la translocación de la FS en la membrana exterior, en las células endoteliales vasculares de los tumores, es lo suficientemente estable para que la FS sirva como una entidad objetiva, para la terapia exitosa (usando ya sea anticuerpos desnudos o conjugados terapéuticos).

A pesar de los importantes descubrimientos de la patente US No 6.406.693 (y 6.312.694, ver abajo), las sugerencias para la acción basada en fosfolípidos, de las células endoteliales vasculares de tumores, fueron confinadas a acciones dirigidas de aminofosfolípidos, tales como la FS y FE. A través del desarrollo de herramientas biológicas con especificidad exquisita para diferentes fosfolípidos y aminofosfolípidos, los inventores de la presente han identificado ahora una nueva categoría de fosfolípidos que se encuentran sorprendentemente sobreregulados sorprendentemente en las células endoteliales vasculares de tumores. Estos son los fosfolípidos aniónicos, presentados en esta memoria como marcadores específicos y estables de la vasculatura de tumores, que permiten la intervención terapéutica usando tanto anticuerpos desnudos como inmunoconjugados, que se unen a fosfolípidos aniónicos.

Los fosfolípidos aniónicos se encuentran en gran medida ausentes de la superficie de las células de mamíferos en reposo, en condiciones normales. La fosfatidilserina, que es el fosfolípido aniónico más abundante de la membrana plasmática, se segrega estrechamente en la laminilla interna de la membrana plasmática en la mayor parte de los tipos de células, en condiciones normales (Williamson y Schlegel, 1994; Zwaal y Schroit, 1997). El fosfatidilinositol (FI), otro fosfolípido aniónico principal, se encuentra también situado predominantemente en la laminilla interna de la membrana plasmática (Calderon y DeVries, 1997). Los fosfolípidos aniónicos minoritarios, el ácido fosfatídico (AF) y el fosfatidilglicerol (FG), han sido examinados sólo en unos pocos tipos de células; pero parecen encontrarse también situados principalmente en la laminilla interna de la membrana plasmática (Hinkovska-Galcheva *et al.*, 1989). La Cardiolipina (CL), otro fosfolípido aniónico, se encuentra presente en la membrana mitocondrial y se encuentra ausente de la membrana plasmática (Daum, 1985).
Los fosfolípidos neutros se encuentran también distribuidos asimétricamente en la membrana plasmática. El aminofosfolípido neutro, la fosfatidiletanolamina (FE) se encuentra predominantemente sobre la laminilla interna. Los fosfolípidos neutros que contienen colina, la fosfatidilcolina (FC) y la esfingomielina (EM), se encuentran predominantemente sobre la laminilla externa.

La asimetría de la FS, junto con la de la FE, es mantenida por un transportador dependiente del ATP, el aminofosfolípido translocasa (Mg^{2+} ATPase), que cataliza el transporte de aminofosfolípidos desde la laminilla externa hasta la laminilla interna, de la membrana plasmática (Seigneuret y Devaux, 1984). La pérdida o colapso de la asimetría de la FS y FE resulta del movimiento hacia afuera de estos fosfolípidos en la membrana plasmática y es causado ya sea por la inhibición de la translocasa (Bitbol *et al.*, 1987; Comfurius *et al.*, 1990), la activación de los transportadores de FS y/o la activación de las enzimas escramblasa, las enzimas dependientes de Ca^{2+} que transportan todos los lípidos bidireccionalmente (Zhao *et al.*, 1998).

La pérdida de la asimetría de la FS se observa en diferentes condiciones patológicas y fisiológicas, incluyendo el daño celular, la muerte celular programada y la apoptosis (Blankenberg *et al.*, 1998; Bombeli *et al.*, 1997), el envejecimiento celular (Herrmann y Devaux, 1990), la activación de las plaquetas (Rote *et al.*, 1993; Zwaal *et al.*, 1989), daño (Boyle *et al.*, 1996) y transformación maligna (Sugimura *et al.*, 1994). La exposición de la FS juega también un papel en la fusión intercelular de mioblastos (Sessions y Horwitz, 1981) y trofoblastos (Adler *et al.*, 1995), migración celular (Vogt *et al.*, 1996) y desgranulación celular (Demo *et al.*, 1999). Las células endoteliales exteriorizan FS en respuesta a flujos incrementados de Ca^{2}+ inducidos por la trombina (Qu *et al.*, 1996), ionóforo de calcio o ésteres de forbol (Julien *et al.*, 1997), hiperlipidemia (Lupu *et al.*, 1993), y concentraciones no líticas de proteínas complementarias C5b-9 (Christiansen *et al.*, 1997). La exposición espontánea a la FS ha sido observada también en células malignas en la ausencia de activadores exógenos o daño celular (Utsugi *et al.*, 1991).

Varias consecuencias principales siguen a la exposición de la membrana a la FS. Los macrófagos fagocíticos reconocen, se unen y eliminan las células senescentes y apoptópicas positivas a la FS (McEvoy *et al.*, 1986; Tait y Smith, 1999). La FS también media la unión de los linfocitos T a las células endoteliales activadas por trombina (Qu *et al.*, 1996). El sistema complementario es activado por la FS y contribuye a la lisis de células positivas a la FS (Test y Mitsuyoshi, 1997). Finalmente, la exposición a la FS contribuye a un desplazamiento procoagulante sobre el endotelio (Williamson y Schlegel, 1994; Bombeli *et al.*, 1997) al proporcionar una superficie lípida cargada negativamente para el ensamblaje y activación de complejos de coagulación (Bevers *et al.*, 1985; Dachary-Prigent *et al.*, 1996).El carácter protrombótico del endotelio de los tumores ha sido reconocido desde hace mucho tiempo (Donati y Falanga, 2001).

A pesar de que la bibliografía científica se centra en la FS, y que los trabajos previos de los inventores se confinaron a los aminofosfolípidos tales como la FS y FE (patentes US 6,406,693 y 6,312,694), los inventores de la presente crearon la hipótesis de que una categoría más amplia de fosfolípidos podría llegar a estar expuesta en la vasculatura de los tumores. Debido a las condiciones de tensión incrementada del microambiente del tumor, los inventores razonaron que una variedad de fosfolípidos aniónicos podía estar regulada ascendentemente en la vasculatura del tumor, proporcionando nuevas oportunidades potenciales para la intervención terapéutica.

Los inventores comprendieron que el daño y activación del endotelio de los tumores son causados por: 1) citocinas derivadas de tumores, tales como la interleucina-1 y el factor de necrosis de tumores, que activan al endotelio e inducen la expresión de las moléculas de la adhesión celular (Shaughnessy *et al.*, 1989; Orr *et al.*, 2000); 2) especies de oxígeno reactivo (ROS) generadas por leucocitos que se adhieren al endotelio (Orr *et al.*, 2000); y 3) ROS generadas por células tumorales mismas como un subproducto del metabolismo (Shaughnessy *et al.*, 1989; Soares *et al.*, 1994) o como un resultado de la exposición a la hipoxia seguida de la reoxigenación (Zulueta *et al.*, 1995). Estas observaciones sugirieron que flujos de Ca^{2}+ podrían generarse por estas tensiones dentro del endotelio del tumor que, a su vez causan la exposición de la FS y FE, a través de la activación de la escramblasa o la inhibición de la aminofosfolípido translocasa.

Sin embargo, los inventores ampliaron estas ideas a la hipótesis de que los fosfolípidos aniónicos, no solamente los aminofosfolípidos FS y FE, serían regulados positivamente en la vasculatura del tumor. Para detectar fosfolípidos aniónicos en la superficie celular, los inventores generaron un nuevo anticuerpo monoclonal, el 9D2, que reacciona con los fosfolípidos aniónicos pero no con los fosfolípidos neutros. El 9D2 se diferencia así de los agentes de unión a los aminofosfolípidos generales, en que se une al aminofosfolípido aniónico, FS, pero no al aminofosfolípido neutro,

FE. El anticuerpo 9D2 es también más específico para los fosfolípidos aniónicos que el ligando natural, la anexina V, que se une fuertemente a la PE, además que a los fosfolípidos aniónicos (Blankenberg et al., 1998).

Como se detalló en la presente solicitud, los inventores encontraron que el 9D2 y la anexina V se localizan específicamente en el endotelio de los tumores después de la inyección intravenosa a ratones que contienen varios tipos de tumores sólidos. Este descubrimiento valida la hipótesis de los inventores de que los fosfolípidos aniónicos rutinariamente llegan a quedar expuestos sobre la superficie del endotelio de la vasculatura de los tumores y que pueden ser usados como moléculas objetivo para la terapia de tumores (y para la formación de imágenes de los mismos). La invención proporciona así una variedad de nuevos métodos y composiciones basados en anticuerpos, para el uso en la localización dirigida de fosfolípidos aniónicos y tratamiento de tumores, tanto en términos de anticuerpos desnudos como en la administración de fármacos citotóxicos, citocinas, coagulantes y similares. Además de la localización dirigida de la FS, tal como se describe en las patentes US Nos 6,406,693 y 6,312,694, los fosfolípidos aniónicos actualmente preferidos para la localización dirigida mediante la invención son el PI, un fosfolípido aniónico principal, el AF y el FG , pero también se contempla la localización dirigida del CL en ciertas realizaciones.

Uno de los descubrimientos principales que surgen de la invención es que los fosfolípidos aniónicos se encuentran expuestos en la superficie del endotelio del tumor (Ejemplo VI). Este fenómeno fue demostrado usando dos reactivos independientes que se unen selectivamente a fosfolípidos aniónicos: un anticuerpo monoclonal, 9D2, desarrollado por los inventores particularmente para validar este punto, y la anexina V. El anticuerpo 9D2 y los anticuerpos competidores son componentes adicionales preferidos de la invención.

El anticuerpo 9D2 y la anexina V se unen con alta afinidad y especificidad a los fosfolípidos aniónicos adsorbidos al plástico, como liposomas, o presentados sobre la superficie de la membrana de células endoteliales activadas o apoptóticas *in vitro*. El 9D2 se une fuertemente a FS, AF y CL, pero en forma más débil a FI y FG. La anexina V se une a la FE además de a FS, CL, AF, FI y FG, como se descubrió previamente (Andree *et al.*, 1990; Schlaepfer *et al.*, 1987; Boustead *et al.*, 1993; Blackwood y Ernst, 1990). El reconocimiento de fosfolípidos aniónicos por el anticuerpo 9D2 fue idéntico en presencia y ausencia de suero, lo que indica que la unión no requiere de cofactores de suero. La unión de 9D2 a fosfolípidos aniónicos no requirió de iones Ca^{2+}, mientras que la unión de la anexina V requirió de Ca^{2}+.

Estudios de bloqueo cruzado en placas recubiertas con FS demostraron que el 9D2 y la anexina V no se bloquean entre sí para la unión a la FS. Esto indica que los dos reactivos reconocen diferentes epítopes sobre la molécula de FS, o más probablemente, formas diferentemente empacadas de FS. Se cree que la anexina V se une a las superficies planas de la FS, mientras que se cree que los anticuerpos anti-FS se unen a la FS empacada hexagonalmente (Rauch y Janoff, 1990). Ambas formas se encuentran probablemente presentes sobre placas recubiertas de FS. Estos estudios de bloqueo cruzado prácticos (ejemplo VI) sirven también para demostrar que los anticuerpos que compiten eficazmente por la unión a fosfolípidos aniónicos, es decir, que se unen esencialmente al mismo epítope, pueden ser identificados fácilmente una vez que se proporciona un anticuerpo de referencia (por ejemplo el 9D2).

La presente solicitud demuestra también que el anticuerpo 9D2 y la anexina V se localizan específicamente en vasos de tumores, y en células de tumores, en y alrededor de regiones necróticas de todos los tumores examinados *in vivo* (ejemplo VI). Entre el 15 y 40% de los vasos sanguíneos en los tumores tuvieron endotelio positivo al fosfolípido aniónico. En cambio, ninguno de los vasos sanguíneos en tejidos normales tuvo fosfolípidos aniónicos exteriorizados, detectables.

La especificidad de la tinción de la vasculatura de tumor por el 9D2 fue demostrado por: 1) la falta de tinción de los vasos de tumores por la IgM de rata de control; 2) el bloqueo de la unión del 9D2 o anexina V a las células endoteliales tratadas con H_2O_2 *in vitro* por liposomas preparados a partir de fosfolípidos aniónicos, pero no de fosfolípidos neutros; 3) el descubrimiento de que la extracción de fosfolípidos a partir de secciones de tumor, con detergentes o solventes orgánicos, eliminaba la tinción; y 4) la falta de localización ya sea del 9D2 o de la anexina V al endotelio inactivo en órganos normales.

El principal fosfolípido aniónico que es localizado por el 9D2 o anexina V en la vasculatura de tumores es probablemente la FS, ya que este es el fosfolípido aniónico más abundante y su exposición sobre la superficie celular es regulada por influencias ambientales o daños. Sin embargo, también es probable que otros fosfolípidos aniónicos (por ejemplo FI, AF, FG) queden expuestos, a pesar de ser menos abundantes.

Aunque no es detectado por el 9D2, el principal fosfolípido neutro, la PE, contribuye probablemente, junto con la FS, a la localización de anexina observada en los vasos de tumor. También se sabe que la FE se encuentra expuesta sobre el endotelio de tumores, y la posición de la FE en la membrana plasmática es regulada en una manera similar a la de la FS (patente US 6,406,693). La FE es segregada en la laminilla interna de la membrana plasmática, en parte por la aminofosfolípido translocasa, aunque con menor rapidez que la FS (Devaux, 1992), y es transportada hacia la superficie externa por la escramblasa (Zhou *et al.*, 1997). La FE, al igual que la FS, queda expuesta también durante la apoptosis y activación celular (Emoto *et al.*, 1997; Umeda y Emoto, 1999).

Para examinar el mecanismo de exposición de fosfolípidos aniónicos sobre las células endoteliales de tumores, se llevó a cabo una serie de estudios en los que las células endoteliales *in vitro* fueron tratadas con varios factores y

condiciones que se sabe se encuentran presentes en el microambiente del tumor (Ejemplo VII). La hipoxia seguida de la reoxigenación, acidez, y exposición de la FS incrementada a la trombina, en células endoteliales viables, se encuentra entre el 10 y 22% del nivel observado cuando todas las células son apoptóticas. Las citocinas inflamatorias (TNFα e IL-1) causaron también una inducción débil pero definida de la exposición de la FS.

Estos descubrimientos son coherentes con la posibilidad de que, en tumores, la exposición de fosfolípidos aniónicos o el endotelio vascular es inducida por la hipoxia/reoxigenación en combinación con citocinas inflamatorias, trombina y acidez. Aunque el mecanismo preciso no necesita ser conocido para llevar a la práctica la invención, las células de tumores pueden generar ROS como un subproducto del metabolismo o en respuesta a la hipoxia (Zulueta *et al.*, 1995). Las citocinas liberadas por las células tumorales pueden inducir moléculas de adhesión a leucocitos sobre endotelio, que medien la adhesión de macrófagos activados, células polimorfonucleares y plaquetas, al endotelio de tumor, y la secreción adicional de la ROS. La ROS puede inducir entonces la translocación de la FS a través de la oxidación de moléculas de transporte que contengan tiol o peroxidación de lípidos (Herrmann and Devaux, 1990), posiblemente causando un influjo de Ca^{2+} o liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares (Wang y Joseph, 2000).

La exposición de la FS y de otros fosfolípidos aniónicos explica en parte el estado procoagulante del endotelio de tumores que ha sido reconocido desde hace mucho (Donati and Falanga, 2001). Los fosfolípidos aniónicos proporcionan la superficie sobre la cual se concentran y ensamblan los factores de coagulación (Bevers *et al.*, 1985; Dachary-Prigent *et al.*, 1996). También proporciona un sitio de unión para macrófagos circulantes (McEvoy *et al.*, 1986), linfocitos T (Qu *et al.*, 1996) y células polimorfonucleares que ayudan a la infiltración de los leucocitos hacia los tumores.

Anticuerpos y otros ligandos que se unen a los fosfolípidos aniónicos pueden ser usados entonces para la localización dirigida, la formación de imágenes y/o tratamiento de vasos sanguíneos de tumores. Los fosfolípidos aniónicos son atractivos como vasos objetivos de tumores por varias razones: Son abundantes (la FS se encuentra presente a razón de 3×10^6 moléculas por célula); se encuentran sobre la superficie luminal del endotelio del tumor, a la cual se tiene acceso directamente para la unión por parte de los agentes de localización dirigida vascular en la sangre; se encuentran presentes sobre un mayor porcentaje de las células endoteliales del tumor en diversos tumores sólidos; y se encuentran esencialmente ausentes del endotelio en todos los tejidos normales.

Los agentes de localización dirigida vascular que emplean fármacos o coagulantes son ligeramente eficaces , según se ha demostrado, y a veces curativos, en ratones con tumores sólidos grandes (Huang *et al.*, 1997; Nilsson et al, 2001; patentes US Nos 5,660,827, 5,776,427, 5,855,866, 5,863,538, 5,965,132, 6,004,554, 6,051,230, 6,261,535, 6,093,399, 6,004,555, 5,877,289, y 6,036,955). La presente invención proporciona anticuerpos desnudos y agentes de localización dirigida vascular que son dirigidos contra fosfolípidos aniónicos para el uso en la localización dirigida de la vasculatura de tumores en la diagnosis y tratamiento del cáncer en el hombre.

Aunque no es necesario un entendimiento molecular preciso de cómo funcionan los anticuerpos desnudos dirigidos contra fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos en el tratamiento de tumores, a fin de llevar a la práctica el tratamiento, los inventores han contemplado varios mecanismos que pueden explicar la aniquilación de células endoteliales observada. Los mecanismos favorecidos (particularmente para el anticuerpo 3G4 descrito en esta memoria) son funciones efectoras inmunes mediadas por el dominio Fc, tales como la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la fagocitosis mediada por el anticuerpo. La citotoxicidad mediada por la célula, la lisis mediada por el complemento y/o apoptosis, la señalización de la célula inducida por el anticuerpo y/o las perturbaciones al citoesqueleto pueden encontrarse también involucradas.

La unión de anticuerpos intactos contra fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, particularmente el 3G4, a la superficie celular endotelial vascular, significa que las porciones Fc de los anticuerpos sobresalen en el lumen de los vasos. Como los fragmentos Fc del anticuerpo activan la ruta del complemento, la destrucción celular observada puede ser un resultado de la lisis dirigida por el complemento. La unión del anticuerpo activa entonces la cascada de coagulación dependiente del complemento, causando que complejos de múltiples componentes se ensamblen y finalmente generen un complejo lítico que permeabilice la célula diana. La "ADCC activada por el complemento" puede estar funcionando también en la destrucción, en la que el complemento se une a la célula diana recubierta del anticuerpo, y en la que las células, tales como los neutrófilos, que tienen receptores para el complemento, lisan la célula diana.

Como los anticuerpos desnudos o no conjugados, que incluyen los fragmentos de unión al antígeno del mismo, se unen a fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos en la superficie de las células endoteliales vasculares del tumor, formarán un recubrimiento de anticuerpos sobre la superficie luminal. Este puede funcionar para atraer células efectoras inmunes, tales como las células T citotóxicas y/o células destructoras naturales (NK), que ejercerán un efecto citotóxico mediado por la célula, sobre las células endoteliales vasculares.

La unión del anticuerpo a los fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos puede inducir también apoptosis en las células endoteliales vasculares de los tumores. Aunque no existen reportes conocidos de unión de anticuerpos a la FS que

realmente induzca apoptosis (en vez que la FS como un marcador resulte de la apoptosis), los inventores consideran esto como otro posible mecanismo de los efectos antitumorales observados.

También es posible que la unión del anticuerpo a los fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, en la superficie de las células endoteliales vasculares del tumor, pueda causar perturbaciones en la organización citoesquelética de la célula. Como el citoesqueleto juega un papel en la organización de las membranas superficiales, y como la unión de un anticuerpo puede perturbar (o perturbar adicionalmente) la membrana, la unión de anticuerpos a fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos puede transmitir cambios a las proteínas citoesqueléticas que interactúen con la bicapa. Ya es conocido que la organización espacial de las proteínas citoesqueléticas controla la estabilidad de la membrana y la forma de la célula, y que es posible que la perturbación de cierto equilibrio citoesquelético pueda tener consecuencias de largo alcance en la integridad de la célula.
Un mecanismo adicional de funcionamiento de la invención puede ser que la unión del anticuerpo a los fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, en la superficie de la célula endotelial, pueda iniciar la transducción de señales a través, hasta ahora, de rutas no definidas. La unión del anticuerpo puede perturbar también rutas de transducción de señales conocidas, por ejemplo, alterando la conformación y/o interacciones de los receptores de la membrana, proteínas para la transducción de señales, canales de la membrana, y similares. Las señales para la destrucción celular (apoptosis) pueden ser iniciadas o imitadas, y/o se pueden inhibir las señales de conservación y/u homeostáticas.

Aunque es de interés científico, la determinación de la naturaleza exacta de la destrucción vascular lograda por los anticuerpos desnudos en los fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, no es necesaria para llevar a la práctica el tratamiento. Dado que la administración de esta categoría de anticuerpos resulta ser ventajosa en los efectos antitumorales específicos *in vivo*, el tratamiento puede ser utilizado sin importar el mecanismo molecular que respalde este fenómeno. El uso de anticuerpos desnudos que se unen a los fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, representa entonces un importante avance en la terapia de tumores, proporcionando ventajas en la preparación y en el costo.

C. Anticuerpos cotra Fosfolípidos Aniónicos y Aminofosfolípidos

Como la presente invención identifica una nueva categoría de marcadores de la vasculatura de tumores, los fosfolípidos aniónicos, anticuerpos desnudos e inmunoconjugados, que se unen a uno o más fosfolípidos aniónicos, opcionalmente en combinación con aminofosfolípidos, pueden ser usados ahora en la diagnosis y tratamiento de tumores.

C1. Anticuerpos Policlonales

Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son muy conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; incorporada en la presente memoria como referencia). Para preparar antisueros policlonales un animal se inmuniza con una composición que comprende un fosfolípido aniónico y/o aminofosfolípido, inmunogénico, incluyendo células tratadas con H_2O_2 y otros agentes, como se describe en la presente memoria, y los antisueros recolectados de ese animal inmunizado. Un amplio intervalo de especies animales se puede usar para la producción de antisuero. Típicamente el animal usado para la producción de antisuero es un conejo, ratón, rata, hámster, conejillo de indias o cabra. Debido al volumen relativamente grande de los conejos, un conejo es la elección preferida para la producción de anticuerpos policlonales.

La cantidad de composición de inmunógeno usada en la producción de anticuerpos policlonales varía según la naturaleza del inmunógeno así como el animal usado para la inmunización. Puede usarse una diversidad de vías para administrar el inmunógeno; subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal e intraesplénica. La producción de anticuerpos policlonales se puede monitorizar muestreando sangre del animal inmunizado en varios puntos después de la inmunización. Una segunda inyección de refuerzo, también se le puede dar. El proceso de refuerzo y titulación se repite hasta que se logra una titulación conveniente. Cuando se obtiene un nivel de titulación deseado, el animal inmunizado se puede sangrar y el suero aislar y almacenar. El animal también se puede usar para generar anticuerpos monoclonales.

Como es muy conocido en la técnica, la inmunogenicidad de una composición particular se puede aumentar mediante el uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Los adyuvantes ejemplares incluyen adyuvante completo de Freund, un estimulador no específico de la respuesta inmunitaria que contiene Mycobacterium tuberculosis muertas; adyuvante incompleto de Freund; y adyuvante de hidróxido de aluminio.

También puede desearse el reforzar el sistema inmunológico del huésped, lo que se puede lograr asociando fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos con, o acoplándolos a, un transportador. Los transportadores ejemplares son hemocianina de lapa californiana (KLH) y albúmina de suero bovino (ASB). Otras albúminas tales como la ovoalbúmina, albúmina de suero de ratón o la albúmina de suero de conejo también se pueden usar como transportadores.

Como también se conoce en la técnica, la inmunogenicidad de una composición determinada puede variar. Sin embargo, la generación de anticuerpos contra fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos no es particularmente difícil. Por ejemplo, anticuerpos antifosfatidilserina altamente específicos fueron cultivados en ratones inmunizados mediante inyecciones intramusculares de geles de poliacrilamida que contenían fosfatidilserina y con vesículas de fosfatidilserina citocromo c (Maneta-Peyret *et al.*, 1988; 1989; cada una incorporada en la presente memoria como referencia). El uso de implantes de acrilamida mejoró la producción de anticuerpos (Maneta-Peyret *et al.*, 1988; 1989). Los anticuerpos antifosfatidilserina cultivados en esta manera pueden detectar la fosfatidilserina in situ en plaquetas humanas (Maneta- Peyret *et al.*, 1988). Los grupos de Inoue, Rote y Rauch han desarrollado también anticuerpos anti-FS y anti-FE (ver más adelante).

Aunque la generación de anticuerpos contra fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos puede realizarse a través de varios medios, ciertos métodos preferidos se describen en el ejemplo IV de esta memoria.

C2. Anticuerpos Monoclonales

Varios métodos para generar anticuerpos monoclonales (MAbs) también son muy conocidos ahora en la técnica. Las técnicas de generación de anticuerpos monoclonales más estándares generalmente comienzan a lo largo de las mismas líneas que aquellos para preparar anticuerpos policlonales (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; incorporada en la presente memoria como referencia). Una respuesta de anticuerpo policlonal se inicia inmunizando un animal con una composición de fosfolípido aniónico y/o aminofosfolípido, inmunogénico y, cuando se obtiene un nivel de titulación deseado, el animal inmunizado se puede emplear para generar Mabs. Preferentemente, las técnicas particulares de tamizado y selección, descritas en la presente memoria, se usan para seleccionar anticuerpos con las propiedades posteriores buscadas.

Los Mabs pueden ser fácilmente preparados a través del uso de técnicas muy conocidas, tales como las ilustradas en la Patente US 4,196,265. Típicamente, esta técnica implica inmunizar a un animal conveniente con la composición de inmunógeno seleccionada. La composición inmunizante se administra de una manera eficaz para estimular las células de producción de anticuerpos. Los roedores tales como ratones y ratas son los animales preferidos, sin embargo, el uso de conejos, ovejas y sapos también es posible. El uso de ratas puede proporcionar ciertas ventajas (Goding, 1986, páginas 60-61; incorporada en la presente memoria como referencia), pero se prefieren los ratones, siendo el más preferido el ratón BALB/c y éste se usa de manera más rutinaria y generalmente da un porcentaje más alto de fusiones estables.

Después de la inmunización, las células somáticas con el potencial para producir los anticuerpos deseados, específicamente linfocitos B (células B), se seleccionan para su uso en el protocolo para generar Mabs. Estas células se pueden obtener a partir de bazos, amígdalas o ganglios linfáticos, o de muestras de sangre periférica. Las células del bazo y las células de la sangre periférica se prefieren, las primeras debido a que son una fuente rica de células que producen anticuerpos que están en la etapa de plasmablasto de división, y las últimas porque la sangre periférica es fácilmente accesible. Frecuentemente, un panel de animales habrá sido inmunizado y el bazo del animal con la titulación de anticuerpos más alta será extraído y se obtendrán los linfocitos de bazo mediante homogenización del bazo con una jeringa. Típicamente, un bazo de un ratón inmunizado contiene aproximadamente 5×10^7 hasta 2×10^8 linfocitos.

Los linfocitos B que producen anticuerpos a partir del animal inmunizado se fusionan entonces con células de una célula de mieloma inmortal, generalmente uno de la misma especie que el animal que fue inmunizado. Las líneas de células de mieloma convenientes para su uso en procedimientos de fusión que produce hibridoma preferiblemente son los que no producen anticuerpos, tienen alta eficiencia de fusión, y deficiencias de enzimas que los vuelven incapaces de crecer en ciertos medios selectivos los cuales soportan el crecimiento de solamente las células fusionadas deseadas (hibridomas).

Cualquiera de un número de células de mieloma se puede usar, como se conoce por los expertos en la técnica (Goding, páginas 65-66, 1986; Campbell, páginas 75-83, 1984). Por ejemplo, cuando un animal inmunizado es un ratón, se puede usar P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MTC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; para ratas, se puede usar R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F, 4B210 o una de las líneas celulares de ratón indicadas anteriormente; y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6, todos son útiles en relación con las fusiones de células humanas.

Los métodos para generar híbridos de células de bazo y de ganglios linfáticos que producen anticuerpos y de células de mieloma usualmente comprenden las células somáticas con células de mieloma en una proporción de 4:1, aunque la proporción puede variar de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:1, respectivamente, en presencia de una sustancia o sustancias (químicas o eléctricas) que promueven la fusión de las membranas celulares. Los métodos de fusión usando el virus Rutai se han descrito por Kohler y Milstein (1975; 1976), y aquellos que usan polietilenglicol (PEG), tal como PEG al 37 % (volumen/volumen), por Gefter el al., (1977). El uso de métodos de fusión inducidos eléctricamente también es adecuado (Goding páginas 71-74, 1996).

Los procedimientos de fusión usualmente producen híbridos viables a bajas frecuencias, aproximadamente 1×10^{-6} hasta 1×10^{-8}. Sin embargo, esto no plantea un problema, ya que los híbridos viables, fusionados se diferencian de las

células parentales no fusionadas (particularmente las células de mieloma no fusionadas que normalmente continuarían dividiéndose indefinidamente) cultivando en un medio selectivo. El medio selectivo generalmente es uno que contiene una sustancia que bloquea la síntesis *de novo* de los nucleótidos en el medio de cultivo tisular. Las sustancias ejemplares y preferidas son aminopterina, metotrexato, y azaserina. La aminopterina y el metotrexato bloquean la síntesis *de novo* tanto de purinas como de pirimidinas, mientras que los bloques de azaserina solamente la síntesis de purina. Cuando se usa aminopterina o metotrexato, los medios se complementan con hipoxantina y timidina como una fuente de nucleótidos (medio HAT). Cuando se usa azaserina, los medios se complementan con hipoxantina.

El medio de selección preferido es HAT. Solamente las células capaces de operar rutas recuperadas de nucleótidos son capaces de sobrevivir en el medio HAT. Las células de mieloma carecen de enzimas claves de la ruta de recuperación, es decir, hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), y no pueden sobrevivir. Las células B pueden operar esta ruta, pero tienen una extensión de vida limitada en cultivo y generalmente mueren dentro de dos semanas. Por lo tanto, las únicas células que pueden sobrevivir en el medio selectivo son aquellos híbridos formados a partir de las células B y mieloma.

Este cultivo proporciona una población de hibridomas a partir de la cual se seleccionan los hibridomas específicos. Típicamente, la selección de hibridomas se realiza mediante el cultivo de células por dilución de clona única en placas de microtitulación seguidas por probar los sobrenadantes clonales individuales (después de aproximadamente dos a tres semanas) para la reactividad anti-VEGF deseada. La prueba podría ser sensible, simple y rápida, como los radioinmunoensayos, los inmunoensayos de enzimas, los ensayos citotóxicos, los ensayos de placa, los ensayos de inmunoenlace de punto, y similares.

Los hibridomas seleccionados se diluirían en serie y se clonarían en líneas celulares que producen anticuerpos individuales, cuyos clones pueden propagarse indefinidamente para proporcionar Mabs. Las líneas celulares se pueden explotar a la producción de Mabs en dos maneras básicas. Una muestra de hibridoma se puede inyectar (a menudo en la cavidad peritoneal) en un animal histocompatible del tipo que se usó para proporcionar las células somáticas y de mieloma para la fusión original. El animal inyectado desarrolla tumores secretando el anticuerpo monoclonal específico producido por el híbrido de célula fusionada. Los fluidos corporales del animal, tales como suero o fluido ascítico, se pueden entonces golpear para proporcionar Mabs a alta concentración. Las líneas celulares individuales podrían también ser cultivadas *in vitro*, en donde los Mabs se secretan naturalmente en el medio de cultivo a partir del cual pueden fácilmente obtenerse en altas concentraciones.

Los Mabs producidos por cualquier medio generalmente se purificarán adicionalmente, por ejemplo usando filtrado, centrifugación y varios métodos cromatográficos, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento o cromatografía por afinidad, todas aquellas técnicas de purificación son muy conocidas para los expertos en la técnica. Las técnicas de purificación involucran el fraccionamiento para separar el anticuerpo deseado de otros componentes de una mezcla. Los métodos analíticos particularmente convenientes para la preparación de anticuerpos incluyen, por ejemplo cromatografía de proteína A-Sefarosa y/o proteína G-Sefarosa.

D. Anticuerpos de Segunda Generación contra Fosfolípidos Aniónicos y Aminofosfolípidos

La presente invención proporciona anticuerpos de "segunda generación" que se unen a aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, en donde los anticuerpos tienen propiedades mejoradas y/o no sufren de la desventaja asociada con los anticuerpos de la técnica anterior. En la presente memoria se describe un panel de esos anticuerpos, de los cuales los anticuerpos monoclonales 9D2 y 3G4 son los que comúnmente se prefieren, y el anticuerpo 3G4 (ATCC 4545) es particularmente preferido. La invención proporciona también técnicas particulares de inmunización y tamizado, que permiten producir anticuerpos "similares" o "competidores" con propiedades ventajosas y/o menos desventajas.

D1. Propiedades de Anticuerpos

Los anticuerpos de segunda generación de la invención, se unen a los aminofosfolípidos y a los fosfolípidos aniónicos y no tienen aún propiedades patogénicas asociadas usualmente con anticuerpos para esos fosfolípidos. Esto fue posible, en parte, por las nuevas técnicas de inmunización y tamizado, desarrolladas por los inventores.

El síndrome, o los síndromes antifosfolípido (APS) están asociados con autoanticuerpos denominados anticuerpos "anticardiolipina" y "anticuerpos anticoagulantes del lupus". Estos síndromes se encuentran asociados con una predisposición a la tromboembolia venosa y arterial, trombocitopenia y a un número de síndromes neurológicos. Los anticuerpos antifosfolípidos en estos pacientes son por tanto "anticuerpos patógenos".

Aunque durante años se describieron como "anticuerpos antifosfolípidos" y "anticuerpos anti-FS", dichos anticuerpos patógenos reconocen en efecto cofactores proteínicos que se unen a la cardiolipina, a la FS o a ambas, y no a los propios fosfolípidos (Galli *et al.*, 1990 1993; McNeil *et al.*, 1990; Rote, 1996). Los anticuerpos anticardiolipina reconocen una región particular (entre el resto 281 y el resto 288) en la β2-glucoproteína I, mientras que los anticuerpos anticoagulantes de lupus reconocen la protrombina. Similarmente, los anticuerpos anti-FE que se

presentan en estado de enfermedad se unen a la FE en combinación con proteínas, tales como el cininógeno (HK) de alto peso molecular, precalicreína y factor XI (Sugi y McIntyre, 1995; 1996a; 1996b). En base a este tipo de reconocimiento de proteínas, los anticuerpos antifosfolípidos en pacientes desplazan los cofactores proteínicos de los fosfolípidos, creando así los síntomas de la enfermedad.

Los anticuerpos de la presente invención han sido seleccionados particularmente en base a que no se unen a los aminofosfolípidos y a los fosfolípidos aniónicos en combinación con cofactores proteínicos, sino que más bien son "verdaderos" anticuerpos antifosfolípidos. Como tales los anticuerpos de la invención no se unen o desplazan los cofactores proteínicos de los fosfolípidos y por lo tanto son de administración segura. En efecto, los ratones tratados con los anticuerpos de la invención a dosis elevadas, por períodos prolongados, no mostraron cambios en la capacidad de coagulación, pero los ratones responden con APS cuando son inyectados con anticardiolipina o con anticuerpos anticoagulantes de lupus.
Sin importar los mecanismos fundamentales, los anticuerpos antifosfolípidos que se presentan en la población humana están correlacionados con las enfermedades autoinmunes, por ejemplo, con el lupus eritematoso sistémico (Branch *et al.*, 1987; Staub *et al.*, 1989; Drouvalakis y Buchanan, 1998; Smirnov *et al.*, 1995; Rauch *et al.*, 1986; Rauch y Janoff 1990) y la pérdida de embarazo recurrente (Rote *et al.*, 1995; Rote, 1996; Vogt *et al.*, 1996; 1997; Katsuragawa *et al.*, 1997). Ninguno de dichos síntomas se ha asociado cuando los anticuerpos de la presente invención se administran a ratones o a monos.

También, el epítope reconocido por los anticuerpos de la invención, tales como los anticuerpos 9D2 y 3G4 (ATCC 4545), no es el mismo que el reconocido por la anexina V. Esto se demuestra en esta memoria ya que los agentes no bloquean en forma cruzada la unión de unos con otros a fosfolípidos. El epítope reconocido por los anticuerpos 3G4 y 9D2 es probablemente una forma de FS compactada hexagonalmente, la cual es la forma inmunogénica. La anexina V se une probablemente a la FS plana además de a la forma hexagonal. La forma hexagonal de concentrados de FS en protuberancias en la membrana plasmática está asociada con la activación celular y en "ampollas" en células apoptóticas. La distribución restringida de los anticuerpos de la invención, tales como los anticuerpos 9D2 y 3G4 (ATCC4545), contribuye por tanto además a la falta de toxicidad detectable y a la falta de efecto sobre la coagulación de los anticuerpos.

A fin de generar anticuerpos para crear aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, con propiedades ventajosas y/o sin efectos secundarios o efectos secundarios reducidos, la invención proporciona métodos de inmunización y tamizado. Otras técnicas de inmunización y anticuerpos han sido descritas en la bibliografía (Umeda *et al.*, 1989; Igarashi *et al.*, 1991; Rote *et al.*, 1990), incluyendo aquellas con especificidad descrita para el tipo de cadenas de ácidos grasos involucradas (Levy *et al.*, 1990, Qamar *et al.*, 1990).

Umeda *et al.*, (1989) describieron la producción de anticuerpos monoclonales que reconocen epítopes estereoespecíficos de fosfatidilserina. Sin embargo, el sistema de Umeda tiene la desventaja de usar la inmunización directa de fosfatidilserina en el bazo del ratón usando una muestra de aminofosfolípido recubierto con *Salmonella* (Umeda *et al.*, 1989). Muchos de los anticuerpos descritos por Umeda *et al.*, (1989) exhiben también una actividad anticoagulante, la cual es una desventaja no asociada con los anticuerpos de la invención. El perfil de unión del anticuerpo 3G4 es diferente al del anticuerpo PSC8 de Umeda *et al.*, (1989).

Los anticuerpos de la presente invención tienen la ventaja de reconocer todos o la mayoría de los aminofosfolípidos aniónicos, lo cual puede proporcionar más objetivos para la unión. Por lo tanto los anticuerpos de segunda generación, de la invención, pueden ser definidos como aquellos que tienen la misma, o sustancialmente la misma, especificidad por el fosfolípido que los anticuerpos 9D2 o 3G4 (ATCC 4545), tal como se describe en la Tabla 4 de la presente invención.

Igarashi *et al.*, (1991) también describen la inducción de anticuerpos anti-FS, pero usan nuevamente la inmunización intraesplénica y se observó únicamente un ligero incremento de la titulación cuando el antígeno se inyectó nuevamente por vía intravenosa. La mayoría de los anticuerpos monoclonales de Igarashi *et al.*, (1991) reaccionaron en forma cruzada con el ADN y muchos exhibieron actividad anticoagulante del lupus, desventajas ningunas de las cuales existen en los anticuerpos desarrollados por los inventores de la presente. El perfil de unión del anticuerpo preferido 3G4, de la invención, es también diferente al de los anticuerpos de la Tabla 1 de Igarashi *et al.*, (1991).

Otras personas han descrito las actividades anticoagulantes del lupus de los anticuerpos monoclonales de murino que reaccionan en forma cruzada con más de un fosfolípido aniónico (Alving *et al.*, 1987; Rauch & Janoff, 1990), pero los inventores de la presente no han experimentado dificultad de obtener anticuerpos libres de actividad anticoagulante de lupus. Esto representa una ventaja distinta de los métodos, anticuerpos y anticuerpos competidores, de conformidad con la presente invención.

Además de evitar el uso de anticuerpos de pacientes, tal como se describe en Rauch *et al.*, (1986), Hasegawa *et al.*, (1994), Ravirajan *et al.*, (1995) y Menon *et al.*, (1997), la presente solicitud demuestra también las propiedades ventajosas de los anticuerpos proporcionados por esta invención en comparaciones, una a una, con los anticuerpos existentes en la bibliografía, tal como el anticuerpo 3SB descrito por Rote *et al.*, (1993). Aunque el anticuerpo 3SB tiene propiedades apropiadas para el uso en varios de los métodos descritos en esta memoria, los anticuerpos

desarrollados por los inventores de la presente reproducen no obstante al anticuerpo 3SB en estudios comparativos, por ejemplo como se muestra en la presente memoria por los efectos antivirales incrementados de los anticuerpos 3G4 al contrario del anticuerpo 3SB (ejemplo XIII).

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser caracterizados por su afinidad. Antes de la invención, los anticuerpos en la bibliografía tenían una afinidad relativamente débil (en donde se describe) en ciertas realizaciones, los anticuerpos de segunda generación de la invención y se definen entonces como aquellos que tienen una afinidad por la FS de al menos igual afinidad de los anticuerpos 9D2 o 3G4 (ATCC 4545), en particular cuando se mide en un ELISA tal como se describe en la presente memoria, descrito en la Tabla 3.

Ms preferentemente, los anticuerpos de segunda generación de la invención se definen como aquellos que tienen una afinidad por la FS al menos igual que la afinidad de los anticuerpos 9D2 o 3G4 (ATCC 4545) por la FS, tal como se describe en la Tabla 3, y porque tienen sustancialmente la misma, o la misma, especificidad por el fosfolípido, que los anticuerpos 9D2 o 3G4 (ATCC 4545), tal como se describe en la Tabla 4, y por no ser dependientes del suero. En la forma más preferente, los anticuerpos de segunda generación son aquellos que tienen una afinidad por la FS al menos igual que la afinidad del anticuerpo 3G4 (ATCC 4545) por la FS, tal como se describe en la Tabla 3, y por tener la misma especificidad por el fosfolípido que el anticuerpo 3G4 (ATCC 4545), tal como se describe en la Tabla 4.

D2. Tecnologías CDR

Los anticuerpos están compuestos por regiones variables y regiones constantes. El término "variable", tal como se usa en la presente memoria, con referencia a los anticuerpos, significa que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensivamente en la secuencia entre anticuerpos, y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular a su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no es distribuida uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos. Se encuentra concentrada en tres segmentos denominados "regiones hipervariables", en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada (diferentes a los anticuerpos camelizados analizados posteriormente).

Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera, nativas, comprenden cada uno cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente), que adoptan en gran medida una configuración de hoja β, conectada por tres regiones hipervariables, que forman rizos que conectan y que en algunos casos forman parte de la estructura de hoja β.

Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (Kabat *et al.*, 1991, incorporada específicamente en la presente memoria como referencia). Los dominios constantes no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

El término "región hipervariable", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (es decir los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-56 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat *et al.*, 1991, incorporada específicamente en la presente memoria como referencia) y/o aquellos restos de un "rizo hipervariable" (es decir los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada). Restos de "estructura" o "FR" son aquellos restos del dominio variable diferentes a los restos de la región hipervariable ya definida en esta memoria.

El ADN y secuencias de aminoácidos deducidas de las cadenas VH y V6 del anticuerpo 3G4 (ATCC 4545) que proporcionan en la presente memoria como SEC ID NO: 1, 2, 3 Y 4, respectivamente. Estas secuencias abarcan la CDR1- 3 de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. En vista a la secuencia y otra información proporcionada en esta memoria, y el conocimiento de la técnica, se puede preparar ahora una gama de anticuerpos similares al 3G4 y mejorado, y regiones de unión al antígeno, y se encuentran entonces comprendidas por la presente invención.

En ciertas realizaciones la invención proporciona al menos una CDR del anticuerpo producido por el hibridoma depositado como ATCC 4545. En otras realizaciones la invención proporciona una CDR, anticuerpo o región de unión al antígeno del mismo, que se une al menos a un primer aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS, y que comprende al menos una CDR del anticuerpo producido por el hibridoma depositado como ATCC 4545.

Aspectos adicionales de la invención conciernen al menos a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos CDR incluida en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 4, o una variante o forma mutagenizada de la misma. Otros aspectos de la invención conciernen a una CDR, anticuerpo, o región de unión al antígeno del mismo, que se une a al menos un primer aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS, y que comprende al menos una CDR con una secuencia de aminoácidos CDR incluida en la secuencia de aminoácidos

de la región variable de la SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 4, o una variante o forma mutagenizada de la misma, donde dicha variante o forma mutagenizada mantiene la unión al aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS.

En una realización particular la invención proporciona un anticuerpo, o una región de unión al antígeno del mismo, en el cual las regiones de la estructura del anticuerpo 3G4 (ATCC 4545) han sido cambiadas de la IgG de ratón a humana, tal como la IgG humana u otra subclase de IgG para reducir la inmunogenicidad en humanos. En otras realizaciones la secuencia del anticuerpo 3G4 (ATCC 4545) son examinadas con respecto a la presencia de epítopes de células T, tal como es conocida en la técnica. La secuencia subyacente puede cambiarse entonces para eliminar los epítopes de las células T, es decir para "desinmunizar" el anticuerpo.

La disponibilidad del ADN y de las secuencias de aminoácidos de las cadenas Vh y Vκ del anticuerpo 3G4 (SEC ID NO: 1, 2, 3 y 4) significa que ahora puede prepararse una gama de anticuerpos usando tecnología CDR. En particular, se realizan mutaciones aleatorias en la CDR y los productos se tamizan para identificar anticuerpos con mayores afinidades y/o mayores especificidades. Esas mutagénesis y selección se llevan a la práctica rutinariamente en las técnicas de anticuerpos. Es particularmente conveniente para el uso en la presente invención, dadas las ventajosas técnicas de tamizado descritas en esta memoria.

Estas técnicas se usan para generar variantes de anticuerpos con propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo original a partir del cual se preparan, tales como los anticuerpos 9D2 y 3G4 (ATCC 4545). Esas variantes, o compuestos de segunda generación, son típicamente variantes de substitución que involucran uno o más restos de región hipervariable, substituidos, de un anticuerpo original. Una forma conveniente para generar esas variantes de substitución es la maduración por afinidad usando la presentación del fago.

En la maduración por afinidad usando la presentación del fago, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo6-7 sitios) son mutados para generar todas las posibles substituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpos así generadas son exhibidas en una forma monovalente de partículas de fago filamentoso, como fusiones al producto del gen III del M13 empacado dentro de cada partícula. Las variantes con presentación del fago son seleccionadas después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se describe en la presente memoria. A fin de identificar sitios de región hipervariable candidatos, para modificación, se puede llevar a cabo la mutagénesis de exploración de alanina, para restos de región hipervariable identificados, que contribuyan significativamente a la unión al antígeno.

Las tecnologías de redistribución e implante de CDR pueden ser usadas también con los anticuerpos de la presente invención, preferentemente los anticuerpos 9D2 y 3G4 (ATCC 4545). La redistribución de CDR inserta secuencias de CDR en una región marco conservada específica (Jirholt *et al.*, 1998). Las técnicas de implante de CDR permiten la combinación aleatoria de secuencias CDR en una sola estructura maestra (Soderlind *et al.*, 1999, 2000). Usando esas técnicas, las secuencias de CDR del anticuerpo 3G4 (ATCC 4545), por ejemplo, son mutagenizadas para crear una pluralidad de diferentes secuencias, que son incorporadas en una secuencia de andamiaje y las variantes de anticuerpo resultantes seleccionadas con respecto a las características deseadas, por ejemplo una mayor afinidad.

En vista a la información de la presente descripción, el fragmento de la unión al antígeno de los anticuerpos, preferentemente de los anticuerpos 9D2 3G4 (ATCC 4545), puede ser también minimizado, proporcionando una estabilidad mejorada. Esto puede conseguirse preparando proteínas de unión de un solo dominio en base a los dominios V_H y similares al V_H de la inmunoglobulina (Nuttall *et al.*, 2000).

En forma alternativa o adicional, la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo puede ser delineada y analizada para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el aminofosfolípido o fosfolípido aniónico objetivo, por ejemplo la FS. Esos restos de contacto y restos vecinos son candidatos para la substitución. Una de esas variantes se genera, el panel de variantes es sometido al tamizado, tal como se describe en la presente memoria, y los anticuerpos con propiedades análogas pero diferentes o inclusive superiores, en uno o más ensayos relevantes, son seleccionados para desarrollo adicional.

D3. Anticuerpos Camelizados

Ejemplos adicionales de anticuerpos de la invención son los anticuerpos "camelizados". Los anticuerpos de camellos y llamas (Camelidae, camélidos) incluye un tipo único de anticuerpo, que carece de cadenas ligeras y está formado entonces únicamente de cadenas pesadas. Estos han sido denominados "anticuerpos camelizados". El sitio de unión al antígeno de esos anticuerpos es de un solo dominio, al cual se hace referencia como V_{HH} (VHH).

Como las secuencias de ADN y aminoácidos de las cadenas Vh y Vκ del anticuerpo 3G4 (ATCC 4545) son proporcionadas en la presente memoria (SEC ID Nos: 1, 2, 3 y 4), se pueden preparar las versiones camelizadas del anticuerpo 3G4. Mutaciones y adaptaciones estructurales pueden ser realizadas para remodelar un V_H de un par V_H-V_L en un V_{HH} de un solo dominio con retención de variabilidad suficiente (Muyldermans *et al.*, 2001). Dichas construcciones V_{HH} son unidades de reconocimiento pequeñas, robustas y eficientes (Riechmann y Muyldermans, 1999) con una potente capacidad de unión al antígeno, que pueden proporcionar la ventaja adicional de interactuar

con epítopes novedosos que son inaccesibles a los pares V_H-V_L convencionales. De esta manera, los anticuerpos camelizados están emparentados con los fragmentos Fv pero pueden tener beneficios adicionales.

La patente US 5.800.988, la US 6.005.079, la solicitud PCT No WO 94/04678, para la solicitud No WO94/25591, Riechmann & Muyldermans (1999) y Muyldermans *et al.*, (2001) describen en forma aún adicional y permiten la producción de anticuerpos camelizados. Por consiguiente, la CDR del anticuerpo 3G4 puede ser injertada sobre la región maco conservada del dominio variable de la inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo *Camelidae*.

D4. Secuencias CDR

Aspectos adicionales de la invención conciernen entonces a segmentos de ADN aislados y a vectores recombinantes que codifican regiones CDR de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos, tales como 9D2 y 3G4, y por ejemplo el 3G4 (ATCC 4545), cadenas pesadas y ligeras, y la creación y uso de células huésped recombinantes y fagos a través de la aplicación de la tecnología de ADN, que expresa esas regiones CDR.
La invención proporciona entonces un polinucleótido aislado que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una CDR del anticuerpo producido por el hibridoma depositado como ATCC 4545. La invención proporciona además un polinucleótido aislado que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una CDR, anticuerpo, o región de unión al antígeno, del mismo, que se une al menos a un primer aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS , y que comprende al menos una CDR del anticuerpo producido por el hibridoma depositado como ATCC 4545.

Aspectos adicionales de la invención conciernen a un polinucleótido aislado que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 4, o una variante o forma mutagenizada de la misma. Otros aspectos de la invención conciernen a un polinucleótido aislado que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una CDR, anticuerpo, o región de unión al antígeno, de la misma, que se une al menos a un primer aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS , y que comprende una CDR con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 4, o una variante o forma mutagenizada de las mismas, en donde esa variante o forma mutagenizada mantiene la unión al aminofosfolípido o al fosfolípido aniónico, preferentemente FS .

En otros aspectos de la invención, el polinucleótido aislado contiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 3, o una variante o forma mutagenizada de la misma. En particular el polinucleótido aislado contiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 3, o una variante o forma mutagenizada de la misma, en donde la secuencia de nucleótidos codifica una CDR, anticuerpo, o región de unión al antígeno, de la misma, que se une al menos a un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS , en donde cualquiera de esas variantes o formas mutagenizadas mantiene la unión al aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, preferentemente FS .

La presente invención concierne entonces a un polinucleótido y segmentos de ADN, que pueden ser aislados a partir de cualquier mamífero, preferentemente humano o murino, que se encuentran libres del ADN genómico total y que pueden expresar regiones CDR de cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo antifosfolípido aniónico o antiaminofosfolípido, tal como 9D2 y 3G4, y preferentemente 3G4 (ATCC 4545), cadenas pesadas y ligeras. Como se usa en la presente memoria, los términos "segmento de polinucleótido" y "segmento de ADN" se refiere a polinucleótidos y moléculas de ADN que han sido aisladas libres del ADN genómico total de una especie particular. Incluido dentro del término "segmento de polinucleótido" y "segmento de ADN", se encuentran segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de esos fragmentos, y también vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo plásmidos, cósmidos, fagos, virus, y similares.

En forma similar, un segmento de ADN que comprende un segmento codificador o una porción de gen aislada que codifique regiones CDR purificadas de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo antifosfolípido aniónico o antiaminofosfolípido, tales como el 9D2 y 3G4, y preferentemente el 3G4, cadenas pesadas y ligeras, se refiere a un segmento de ADN que incluye esas secuencias codificadoras y, en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, aisladas sustancialmente lejos de otros genes que se presentan en forma natural o secuencias codificadoras de proteínas. En este respecto el término "gen" se usa por simplicidad para hacer referencia a una proteína funcional, unidad codificadora de polipéptido o péptido. Como comprenderán los experimentados en la técnica, este término funcional incluye las secuencias codificadoras de anticuerpos nativos y segmentos más pequeños producidos por ingeniería, que expresan, o pueden ser adaptados para expresar, proteínas, polipéptidos o péptidos de unión al antígeno, apropiados.

"Aislados sustancialmente lejos de otras secuencias codificadoras" significa que el segmento codificador o porción de interés del gen aislado forma la parte significativa de la región codificadora del segmento de ADN, y que el segmento de ADN no contiene porciones grandes de ADN codificador que se presenten naturalmente, tales como fragmentos cromosómicos grandes u otros genes funcionales o regiones codificadoras de ADNc. Por puesto que esto se refiere al segmento de ADN como se aísla originalmente y no excluye genes o regiones codificadoras adicionadas posteriormente al segmento por la mano del hombre.

En realizaciones particulares la invención concierne a segmentos codificadores aislados o porciones de genes aisladas y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican regiones CDR de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos antifosfolípido aniónico o antiaminofosfolípido, tales como 9D2 y 3G4, y preferentemente 3G4, cadenas pesadas y ligeras, que comprenden al menos una primera región de secuencia que incluye una región de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 75%, más preferentemente, al menos aproximadamente 80%, más preferentemente al menos aproximadamente 85%, más preferentemente, al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, y en la forma más preferente, al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o valor similar de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 4; en donde las regiones CDR mantienen al menos sustancialmente las propiedades biológicas de las regiones CDR de secuencias de aminoácidos SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 4.

Como se describe en la presente memoria, las secuencias pueden comprender ciertos aminoácidos equivalentes en funcionalidad biológica o "substituciones conservadoras". Otras secuencias pueden comprender aminoácidos funcionalmente no equivalentes o "substituciones no conservadoras" manipuladas deliberadamente por ingeniería genética para mejorar las propiedades de la CDR o anticuerpo que contenga la CDR, como es conocido por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica y descrito adicionalmente en la presente memoria.

También se comprenderá que las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos pueden incluir restos adicionales tales como aminoácidos N-terminal o C-terminal, adicionales, o secuencias 5' o 3', y corresponder todavía a una secuencia de la invención, siempre y cuando la secuencia cumpla con los criterios presentados anteriormente, y que incluyan preferentemente la manutención y mejoría de la actividad biológica de la proteína en donde la expresión de la proteína se encuentre involucrada. La adición de secuencias terminales incluye varias secuencias no codificadoras que flanquean las porciones ya sea 5' o 3' de la región codificadora y también de las regiones de control.

Los segmentos de ácido nucleico de la invención pueden ser entonces combinados con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción, adicionales, sitios de clonación múltiples, otros segmentos codificadores, y similares, de manera tal que su longitud total pueda variar considerablemente. Por lo tanto se contempla que un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud pueda ser empleado, y la longitud total se encuentra limitada preferentemente por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante usado.

Los vectores recombinantes forman entonces aspectos adicionales de la invención. Vectores particularmente útiles son contemplados como aquellos vectores en los cuales la porción codificadora del segmento de ADN se encuentra ubicada bajo el control de un promotor. Generalmente, aunque no exclusivamente, se empleará un promotor recombinante o heterólogo, es decir un promotor no asociado normalmente con secuencias codificadoras en su ambiente natural. Esos promotores pueden incluir promotores bacterianos, virales, eucarióticos y de mamíferos, siempre y cuando el promotor dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el tipo de célula, organismo, o inclusive animal, seleccionado para la expresión.

El uso de combinaciones de promotor y tipo de célula, para la expresión de proteínas, es conocido por los experimentados en la técnica de la biología molecular. Los promotores empleados pueden ser constitutivos, o inducibles, y pueden ser usados en las condiciones apropiadas para dirigir una expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas o péptidos recombinantes.

La expresión de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención puede ser conseguida convenientemente a través de cualquiera de uno o más procedimientos estándares conocidos por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica y se describen adicionalmente en esta memoria. Por ejemplo, la última descripción de la expresión recombinante de proteínas de fusión aplica igualmente bien a anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que no se encuentren asociados funcionalmente con otra secuencia codificadora a nivel de ácidos nucleicos.

E. Técnicas Adicionales de Preparación de Anticuerpos

E1. Anticuerpos de Bibliotecas de Fagémidos

La tecnología recombinante ahora permite la preparación de anticuerpos que tienen la especificidad deseada a partir de genes recombinantes que codifican un intervalo de anticuerpos (Van Dijk y colaboradores, 1989). Ciertas técnicas recombinantes usan el aislamiento de genes de anticuerpos por selección inmunológica de bibliotecas de expresión de fagos de inmunoglobulina combinatoria preparadas a partir de ARN aislado del bazo de un animal inmunizado (Morrison y colaboradores, 1986; Winter y Milstein, 1991; Barbas *et al.*, 1992).

Para estos métodos, las bibliotecas de fagémidos de inmunoglobulina combinatoria se preparan a partir de ARN aislado a partir del bazo del animal inmunizado, y los fagémidos que expresan los anticuerpos adecuados se seleccionan por lavado en batea, usando células que expresan el antígeno de las células de control. Las ventajas de este enfoque sobre las técnicas de hibridoma convencionales son que aproximadamente 10^4 veces tantos anticuerpos se pueden producir y seleccionar en una sola ronda, y que se general nuevas especificidades por la combinación de la cadena H y la cadena L, lo cual aumenta adicionalmente el porcentaje de anticuerpos adecuados generados.

Un método para la generación de un gran repertorio de diversas moléculas de anticuerpos en bacterias utilizan, como vector, al bacteriófago lambda (Huse y colaboradores, 1989; incorporada en la presente memoria como referencia). La producción de anticuerpos que usan el vector lambda implica la clonación de poblaciones de cadenas pesadas y ligeras de las secuencias de ADN en vectores iniciales por separado. Los vectores se combinan después aleatoriamente para formar un solo vector que dirige la coexpresión de cadenas pesadas y ligeras para formar fragmentos de anticuerpos. Las secuencias de ADN de cadena pesada y ligera se obtienen por amplificación, preferiblemente por reacción en cadena de la polimerasa (PCR^{MR}) o una técnica de amplificación relacionada, de ARNm aislado a partir de células de bazo (o hibridomas de las mismas) de un animal que se ha inmunizado con un antígeno seleccionado. Las secuencias de cadena pesada y ligera típicamente se amplifican usando cebadores que incorporan sitios de restricción en los extremos del segmento de ADN amplificado para facilitar la clonación de los segmentos de cadena pesada y ligera en los vectores iniciales.

Otro método para la generación y selección de bibliotecas grandes de sitios de combinación de anticuerpos enteros o parcialmente sintéticos, o paratopos, utiliza vectores de presentación derivados de fagos filamentosos, tales como M13, fl o fd. Estos vectores de presentación de fagos filamentosos, conocidos como "fagémidos", producen grandes bibliotecas de anticuerpos monoclonales que tienen diversas y novedosas inmunoespecificidades. La tecnología usa un dominio de anclaje de membrana de proteína de recubrimiento de fago filamentoso como un medio para unir el producto del gen y el gen durante la etapa de ensamblaje de la replicación de fago filamentoso, y se ha usado para la clonación y expresión de anticuerpos a partir de bibliotecas combinatorias (Kang y colaboradores, 1991; Barbas y colaboradores, 1991).

Esta técnica general para la presentación de fagos filamentosos se describe en la Patente US 5,658,727. En un sentido más general, el método proporciona un sistema para la clonación y selección simultánea de especificidades de unión con ligando preseleccionado a partir de repertorios de genes de anticuerpos usando un solo sistema de vector. La selección de miembros aislados de la biblioteca para una capacidad unión de ligando preseleccionada permite la correlación de la capacidad de unión de una molécula de anticuerpo expresada con un medio conveniente para aislar el gen que codifica al miembro de la biblioteca.

El enlace de la expresión y la selección se llevan a cabo mediante la combinación del direccionamiento de un polipéptido de fusión en el periplasma de una célula bacteriana para permitir el ensamblaje de un anticuerpo funcional, y el direccionamiento de un polipéptido de fusión sobre el recubrimiento de una partícula de fago filamentoso durante el ensamblaje del fago para permitir la selección conveniente del miembro de interés de la biblioteca. El direccionamiento periplásmico se proporciona por la presencia de un dominio de señal de secreción en un polipéptido de fusión. El direccionamiento de una partícula de fago se proporciona mediante la presencia de un dominio de ancla de membrana de proteína de recubrimiento de fago filamentoso (es decir, un dominio de anclaje de membrana derivada de cpIII o cpVIII) en un polipéptido de fusión.

La diversidad de una biblioteca de anticuerpos combinatorios basados en fagos filamentosos se puede aumentar redistribuyendo los genes de cadenas pesadas y ligeras, alterando una o más de las regiones determinantes de la complementariedad de los genes de cadena pesada clonados de la biblioteca, o introduciendo mutaciones aleatorias en la biblioteca mediante la reacción en cadena de la polimerasa propensa a error. Otros métodos para seleccionar bibliotecas de fagémidos se describen en las Patentes US 5,580,717; 5,427,908; 5,403,484; y 5,223,409.

Se ha desarrollado otro método para la selección de grandes bibliotecas de anticuerpos combinatorios, utilizando la expresión de poblaciones de diversas secuencias de cadenas pesadas y ligeras en la superficie de un bacteriófago filamentoso, tal como M13, fl o fd (Patente US 5,698,426; incorporada en la presente memoria como referencia). Dos poblaciones de diversas secuencias de cadenas pesada (Hc) y ligera (Lc) se sintetizan mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR^{MR}). Estas poblaciones se clonan en vectores basados en M13 separados que contienen los elementos necesarios para la expresión. El vector de cadena pesada contiene una secuencia de proteína de recubrimiento de gen VIII (gVIII), de manera que la traducción de la secuencia de cadena pesada produce las proteínas de fusión gVIII-Hc. Las poblaciones de dos vectores se combinan aleatoriamente, de manera que solamente las porciones del vector que contienen las secuencias Hc y Lc se unen en un solo vector circular.

El vector combinado dirige la coexpresión tanto de las secuencias Hc y Lc para ensamblar los dos polipéptidos y la expresión de superficie en M13 (Patente US 5,698,426; incorporada en la presente memoria como referencia). La etapa de combinación aleatoriamente junta secuencias de codificación Hc y Lc diferentes dentro de dos poblaciones distintas en un solo vector. Las secuencias de vectores donados de cada vector independiente son necesarias para la producción de un fago viable. También, ya que las secuencias de seudo gVIII están contenidas solamente uno de los dos vectores iniciales, la coexpresión de fragmentos de anticuerpos funcionales como proteínas de fusión gVIII-Hc asociados con Lc no se puede llevar a cabo en la superficie del fago hasta que las secuencias del vector se enlace en un solo vector.

La expresión superficial de la biblioteca de anticuerpos se realiza en una cepa supresora de ámbar. Un codón de terminación de ámbar entre la secuencia Hc y la secuencia gVIII desenlaza los dos componentes en una cepa no supresora. Aislando el fago producido a partir de la cepa no supresora e infectando una cepa supresora se unirán las

secuencias Hc con la secuencia gVIII durante la expresión. Cultivando la cepa supresora después de la infección se permite la coexpresión en la superficie de M13 de todas las especies de anticuerpos dentro de la biblioteca como proteínas de fusión gVIII (proteínas de fusión gVIII-Fab). Alternativamente, el ADN se puede aislar a partir de la cepa no supresora y luego introducirse en una cepa supresora para llevar a cabo el mismo efecto.

La biblioteca de expresión superficial se selecciona para determinar fragmentos específicos Fab que se unen con moléculas preseleccionadas mediante procedimientos de aislamiento por afinidad estándares. Estos métodos incluyen, por ejemplo, lavado con batea (Parmley y Smith, 1988), cromatografía por afinidad y procedimientos de transferencia en fase sólida. El lavado con batea se prefiere, debido a que se pueden seleccionar titulaciones altas de fago fácilmente, rápidamente y en volúmenes pequeños. Además, este procedimiento puede seleccionar fragmentos menores de Fab de especies dentro de la población, lo cual de otro modo habría sido indetectable, y amplificar a poblaciones sustancialmente homogéneas. Los fragmentos Fab seleccionados se pueden caracterizar secuenciando los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos después de la amplificación de la población de fagos.

Otro método para producir distintas bibliotecas de anticuerpos y seleccionar las especificidades de unión deseables se describen en la Patente US 5,667,988, y la US 5,759,817. El método implica la preparación de bibliotecas de moléculas de inmunoglobulina heterodimérica en forma de bibliotecas de fagémidos que usan oligonucleótidos degenerados y reacciones de extensión de cebadores para incorporar las degeneraciones en las regiones de CDR de los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras variables de inmunoglobulina, y desplegar los polipéptidos mutagenizados en la superficie del fagémido. Después de eso, la proteína de presentación se selecciona por su capacidad para unirse con un antígeno preseleccionado.

El método para producir una molécula de inmunoglobulina heterodimérica generalmente implica (1) introducir un gen de codificación de región V de cadena pesada o ligera de interés en el vector de presentación de fagémido; (2) introducir un sitio de unión aleatorizado en el vector de proteína de presentación de fagémido por la extensión del cebador con un oligonuleótido que contiene regiones de homología para una CDR del gen de región V de anticuerpo y que contiene regiones de degeneración para producir secuencias de codificación aleatorizadas para formar una gran población de vectores de presentación, cada una una de ellas capaz de expresar diferentes sitios de unión supuestos presentados sobre una proteína de presentación de superficie de fagémido; (3) expresar la proteína de presentación y el sitio de unión sobre la superficie de una partícula de fago filamentoso; y (4) aislar (seleccionar) la partícula de fago expresada en la superficie usando técnicas de afinidad, tales como selección de partículas de fago contra un antígeno previamente seleccionado, aislando mediante esto una o más especies del fagémido que contiene una proteína de presentación que contiene un sitio de unión que se une con un antígeno preseleccionado.

Otra variación de este método para producir diversas bibliotecas de anticuerpos y seleccionar especificidades de unión deseables se describe en la Patente US 5,702, 892. En este método, solamente se emplean secuencias de cadena pesada, las secuencias de cadena pesada se aleatorizan en todas las posiciones del nucleótido, las cuales codifican, ya sea, la región hipervariable CDRI o CDRIII, y la variabilidad genética en las CDR se genera independientemente de cualquier proceso biológico.

En el método, dos bibliotecas se modifican por ingeniería genética para redistribuir los motivos de oligonucleótidos dentro de la región marco conservada de la estructura del gen de cadena pesada. En toda la mutación aleatoria, ya sea de la CDRI o CDRII, las regiones hipervariables en el gen de cadena pesada se reconstruyeron para dar como resultado una colección de secuencias muy diversas. Las proteínas de cadena pesada codificadas por la colección de secuencias de gen mutados posee el potencial para tener todas las características de unión de una inmunoglobulina, al mismo tiempo que requiere solamente una de las dos cadenas de inmunoglobulina.

Específicamente, el método se practica en ausencia de la proteína de cadena ligera de inmunoglobulina. Una biblioteca de fago que despliega proteínas de cadena pesada modificadas se incuba con un ligando inmovilizado para seleccionar clonas que codifican proteínas recombinantes que específicamente enlazan al ligando inmovilizado. El fago unido se disocia del ligando inmovilizado y se amplifica mediante cultivo en células huésped bacterianas. Las placas virales individuales, expresando cada una proteína recombinante diferente, se extienden, entonces las clonas individuales se pueden probar para determinar su actividad de unión.

E2. Anticuerpos de Linfocitos Humanos

Los anticuerpos contra fosfolípidos se presentan en la población humana. Sin embargo estos anticuerpos se encuentran asociados típicamente con la enfermedad y su uso en la presente invención deberá ser preferentemente evitado. Sin embargo, los linfocitos humanos de sujetos saludables pueden ser usados como apropiados para materiales de partida a fin de generar un anticuerpo para el uso en la invención.

La inmunización *in vitro*, o la estimulación de antígenos, se puede usar para generar un anticuerpo humano para el uso En la presente invención. Estas técnicas se pueden usar para estimular los linfocitos de la sangre periférica de sujetos sanos, normales, simplemente estimulando células que producen anticuerpos fosfolípidos aniónicos y amino-fosfolípidos *in vitro*.

Esta "inmunización *in vitro*" implica la activación específica de antígeno de linfocitos B no inmunizados, generalmente dentro de una población mezclada de linfocitos (cultivos de linfocitos mezclados, MLC). Las inmunizaciones *in vitro* también se pueden soportar por el cultivo de células B y el factor de diferenciación y las linfocinas. Los anticuerpos producidos por estos métodos frecuentemente son anticuerpos IgM (Borrebaeck y Moller, 1986).

Se ha descrito otro método (Patente US 5.681.729), en el que puede obtenerse linfocitos humanos que producen principalmente anticuerpos IgG (ó IgA). El método implica, en un sentido general, trasplantar linfocitos humanos a un animal inmunodeficiente, de manera que los linfocitos humanos "agarren" en el cuerpo del animal; inmunizar el animal con un antígeno deseado, de manera que genere linfocitos humanos que produzcan un anticuerpo específico contra el antígeno; y recuperar los linfocitos humanos produciendo el anticuerpo a partir del animal. Los linfocitos humanos así producidos pueden usarse para producir un anticuerpo monoclonal inmortalizando los linfocitos humanos que producen el anticuerpo, clonando los linfocitos originados humanos inmortalizados obtenidos que producen el anticuerpo, y recuperando un anticuerpo monoclonal específico al antígeno deseado a partir de los linfocitos originados humanos inmortalizados clonados.
Los animales inmunodeficientes que pueden emplearse en esta técnica son aquellos que no muestran rechazo cuando los linfocitos humanos se trasplantan a los animales. Estos animales se pueden preparar artificialmente mediante tratamientos físicos, químicos o biológicos. Se puede emplear cualquier animal inmunodeficiente. Los linfocitos humanos se pueden obtener a partir de sangre periférica humana, bazo, ganglios linfáticos, amígdalas o similares.

El "agarre" de los linfocitos humanos trasplantados en los animales se puede realizar únicamente administrando los linfocitos humanos a los animales. La vía de administración no se limita y puede ser, por ejemplo, subcutánea, intravenosa o intraperitoneal. La dosis de linfocitos humanos no se limita, y normalmente puede ser 10^6 hasta 10^8 linfocitos por animal. El animal inmunodeficiente se inmuniza entonces con el antígeno de VEGF deseado.

Después de la inmunización, los linfocitos humanos se recuperan de la sangre, el bazo, los ganglios linfáticos u otros tejidos linfáticos mediante cualquier método convencional. Por ejemplo, las células mononucleares se pueden separar mediante el método de centrifugación Ficoll-Hypaque (gravedad específica: 1.077), y los monocitos recuperados por el método de adsorción de plato de plástico. Las células contaminantes que se originan del animal inmunodeficiente se pueden eliminar usando un antisuero específico para las células del animal. El antisuero se puede obtener, por ejemplo, inmunizando un segundo animal distinto con las células del bazo del animal inmunodeficiente, y recuperando el suero del animal inmunizado distinto. El tratamiento con el antisuero se puede llevar a cabo en cualquier etapa. Los linfocitos humanos también se pueden recuperar mediante un método inmunológico empleando una inmunoglobulina humana expresada en la superficie de la célula como un marcador.

Mediante estos métodos, se pueden obtener linfocitos humanos que principalmente producen anticuerpos IgG e IgA específicos a uno o más fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos seleccionados. Los anticuerpos monoclonales se obtienen entonces a partir de linfocitos humanos mediante inmortalización, selección, crecimiento celular y producción de anticuerpos.

E3. Ratones Transgénicos que Contienen Bibliotecas de Anticuerpos Humanos

La tecnología recombinante ahora está disponible para la preparación de anticuerpos. Además de las bibliotecas de expresión de fagos de inmunoglobulina combinatorias descritas anteriormente, otro enfoque de clonación molecular es preparar anticuerpos a partir de ratones transgénicos que contienen bibliotecas de anticuerpos humanos. Estas técnicas se describen en la Patente US 5,545,807.

En un sentido más general, estos métodos implican la producción de un animal transgénico que ha insertado en su línea germinal de material genético que codifica para cuando menos parte de una inmunoglobulina de origen humano, o que puede rearreglar para codificar un repertorio de inmunoglobulinas. El material genético insertado se puede producir a partir de una fuente humana, o se puede producir sintéticamente. El material puede codificar cuando menos parte de una inmunoglobulina conocida, o puede modificarse para codificar cuando menos parte de una inmunoglobulina alterada.

El material genético insertado se expresa en el animal transgénico, dando como resultado la producción de una inmunoglobulina derivada cuando menos en parte del material genético de inmunoglobulina humana insertado. Se encuentra que el material genético se reacomoda en el animal transgénico, de manera que un repertorio de inmunoglobulinas con parte o partes derivadas del material genético insertado se puede producir, aun si el material genético insertado se incorpora en la línea germinal en la posición incorrecta, o con la geometría incorrecta.

El material genético insertado puede estar en forma de ADN clonado en vectores procariotas, tales como plásmidos y/o cósmidos. Los fragmentos de más grandes se insertan usando vectores de cromosoma artificial de levadura (Burke y colaboradores, 1987), o mediante la introducción de fragmentos de cromosomas (Richer y Lo, 1989). El material genético insertado se puede introducir al huésped de manera convencional, por ejemplo, mediante la inyección u otros procedimientos en huevos fertilizados o en células madre embrionarias.

En aspectos preferidos, un animal huésped que inicialmente no lleva el material genético que codifica regiones constantes de inmunoglobulina se utiliza, de manera que el animal transgénico resultante usará sólo el material genético humano insertado cuando produce inmunoglobulinas. Esto puede realizarse usando un huésped mutante que se presente naturalmente, que carece del material genético relevante, o generando artificialmente mutantes, por ejemplo, en líneas celulares finalmente para crear un huésped del que se ha eliminado el material genético relevante.

Cuando el animal huésped lleva material genético que codifica regiones constantes de inmunoglobulina, el animal transgénico llevará el material genético que se presenta naturalmente y el material genético insertado, y producirá inmunoglobulinas derivadas del material genético que se presenta naturalmente, el material genético insertado, y mezclas de ambos tipos de material genético. En este caso, la inmunoglobulina deseada se puede obtener seleccionando hibridomas derivados del animal transgénico, por ejemplo explotando el fenómeno de la exclusión alélica de la expresión del gen de anticuerpo o la pérdida de cromosoma diferencial.

En cuanto se ha preparado un animal transgénico conveniente, el animal simplemente se inmuniza con el inmunógeno deseado. Dependiendo de la naturaleza del material insertado, el animal puede producir una inmunoglobulina quimérica, por ejemplo, de origen de ratón/humano mezclados, en donde el material genético de origen extraño codifica solamente parte de la inmunoglobulina; o el animal puede producir una inmunoglobulina completamente extraña, por ejemplo, de origen completamente humano, en donde el material genético del origen extraño codifica una inmunoglobulina entera.

Se puede producir antisuero policlonal a partir del animal transgénico después de la inmunización. Las células que producen inmunoglobulina se pueden retirar del animal para producir la inmunoglobulina de interés. Preferiblemente, se producen anticuerpos monoclonales a partir del animal transgénico, por ejemplo, fusionando células del bazo a partir del animal con células de mieloma y seleccionando los hibridomas resultantes para elegir aquellos que producen el anticuerpo deseado. En la presente memoria se describen técnicas adecuadas para estos procesos.

En un enfoque alternativo, el material genético se puede incorporar en el animal, de manera que el anticuerpo deseado se produce en los fluidos corporales, tales como suero o secreciones externas del animal, tales como leche, calostro o saliva. Por ejemplo, insertando material genético *in vitro* que codifica cuando menos parte de una inmunoglobulina humana en un gen de codificación de un mamífero para una proteína de la leche y luego introducir el gen a un huevo fertilizado del mamífero, por ejemplo, mediante inyección, el huevo puede desarrollarse en un mamífero hembra adulto que produce leche que contiene inmunoglobulina derivada cuando menos en parte del material genético de inmunoglobulina humana insertada. El anticuerpo deseado se puede cosechar a partir de la leche. Las técnicas convenientes para llevar a cabo estos procesos se conocen por los expertos en la técnica.

Los animales transgénicos anteriores usualmente se emplean para producir anticuerpos humanos de un solo isotipo, más específicamente un isotipo que es esencial para la maduración de las células B, tales como IgM y posiblemente IgD. Otro método preferido para producir anticuerpos humanos es descrito en las Patentes US 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016 y 5,770,429; en donde se describen animales transgénicos que son capaces de cambiar de un isotipo necesario para el desarrollo de las células B a otros isotipos.

En el desarrollo de un linfocito B, la célula inicialmente produce IgM con una especificidad de unión determinado por las regiones productivamente rearregladas V_H y V_L. Posteriormente, cada célula B y sus células de progenie sintetizan anticuerpos con las mismas regiones V de cadenas L y H, pero pueden cambiar el isotipo de la cadena H. El uso de regiones constantes mu o delta está muy determinado por separación alterna, permitiendo que se coexpresen IgM e IgD en una sola célula. Los otros isotipos de cadena pesada (gamma, alfa y epsilón) solamente se expresan originalmente después de que el suceso de reordenamiento del gen borra los exones mu C y delta C. Este proceso de reordenamiento de genes, denominado cambio de isotipo, típicamente se presenta por la recombinación entre los llamados segmentos de cambio localizado inmediatamente aguas arribade cada gen de cadena pesada (excepto delta). Los segmentos de cambio individuales tienen entre 2 y 10 kb de longitud, y consisten principalmente en secuencias repetidas cortas.

Por estas razones, es preferible que los transgenes incorporen secuencias reguladoras de transcripción dentro de aproximadamente 1-2 kb aguas arriba de cada región de cambio que se va a utilizar para el cambio de isotipo. Estas secuencias reguladoras de transcripción preferiblemente incluyen un promotor y un elemento mejorador, y más preferiblemente incluyen la región flanqueante 5' (es decir, aguas arriba) que se asocia naturalmente (es decir, se presenta en la configuración de línea germinal) con una región de cambio. Aunque una secuencia de franqueo 5' a partir de una región de cambio se puede unir operativamente a una región de cambio diferente para el construcción del transgén, en algunas realizaciones se prefiere que cada región de cambio incorporada en el construcción de transgén tenga una región flanqueante 5' que se presenta inmediatamente aguas arriba en la configuración de línea germinal que se presenta naturalmente. La información de secuencia relacionada con la secuencias de regiones de cambio de inmunoglobulina se conocen (Mills y colaboradores, 1990; Sideras y colaboradores, 1989).

En el método descrito en las Patentes US 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016 y 5,770,429, los transgenes de inmunoglobulinas humanas contenidos dentro del animal transgénico funcionan correctamente a través de la ruta del desarrollo de células B, conduciendo al cambio de isotipos. De conformidad con lo anterior, en este

método, estos transgenes se construyen para producir cambio de isotipo y uno o más de lo siguiente: (1) nivel alto de expresión específica de tipo de célula, (2) reordenamiento de gen funcional, (3) activación de y respuesta a la exclusión alélica, (4) expresión de un repertorio primario suficiente, (5) transducción de señal, (6) hipermutación somática, y (7) dominio del locus del anticuerpo de transgén durante la respuesta inmunitaria.

Un requisito importante para la función de transgén es la generación de un repertorio de anticuerpos primario que sea suficientemente diverso para desencadenar una segunda respuesta inmunitaria para un intervalo amplio de antígenos. El gen de cadena pesada rearreglado consiste en un exón de péptido de señal, un exón de región variable y un arreglo en línea de regiones de regiones constantes de dominios múltiples, cada una de las cuales se codifica por o varios exones. Cada uno de los genes de región constante codifica la porción constante de una clase diferente de inmunoglobulinas. Durante el desarrollo de las células B, las regiones constante proximales a la región V se borran conduciendo la expresión de nuevas clases de cadenas pesadas. Para cada clase de cadena pesada, patrones alternativos de separación de ARN dan lugar tanto a transmembrana como a inmunoglobulinas secretadas.

El locus de la cadena pesada humana consiste en aproximadamente 200 segmentos de gen V que se extienden 2 Mb, aproximadamente 30 segmentos de gen D que se extienden aproximadamente 40 kb, seis segmentos J en ramificación con una extensión de 3 kb, y nueve segmentos de gen de región constante esparcidos sobre aproximadamente 300 kb. El locus completo se extiende aproximadamente 2.5 Mb de la porción distal del brazo largo del cromosoma 14. Los fragmentos de transgén de cadena pesada que contienen miembros de los seis de las familias V_H conocidas, los segmentos de gen D y J, así como las regiones constantes mu, delta, gamma 3, gamma 1 y alfa 1 se conocen (Berman y colaboradores 1988). Los fragmentos genómicos que contienen todos los segmentos de gen necesarios y las secuencias reguladoras a partir de un locus de cadena ligera humana se construyen similarmente.

La expresión de transgenes pesados y ligeros de inmunoglobulina reordenador con éxito usualmente tiene un efecto dominante suprimiendo la reordenación de los genes de inmunoglobulina endógenos en el animal no humano transgénico. Sin embargo, en ciertas realizaciones, es deseable efectuar la inactivación completa de los locus de Ig endógenos, de manera que las cadenas de inmunoglobulina híbrida que comprenden una región variable humana y una región constante no humana (por ejemplo murina) no se pueden formar, por ejemplo, mediante el trans-cambio entre el transgén y las secuencias de Ig endógenas. Usando tecnología de células madre embrionarias y recombinación homóloga, el repertorio de inmunoglobulinas endógenas se puede eliminar fácilmente. Además, la supresión de los genes de inmunoglobulina Ig endógena se puede llevar a cabo usando una variedad de técnicas, tales como tecnología antisentido.

En otros aspectos de la invención, puede ser deseable producir una inmunoglobulina transcambiada. Los anticuerpos que comprenden estas inmunoglobulinas transcambiadas quiméricas se pueden usar para una variedad de aplicaciones en donde es deseable tener una región constante no humana (por ejemplo, murina), por ejemplo, para la retención de funciones efectoras en el huésped. La presencia de una región constante murina puede presentar ventajas sobre una región constante humana, por ejemplo, para proporcionar funciones efectoras murinas (por ejemplo fijación de complemento murino, CCDA), de manera que este anticuerpo quimérico se puede probar en un modelo de enfermedad de ratón. Después de evaluar al animal, la secuencia de codificación de la región variable humana se puede aislar, por ejemplo, mediante amplificación de PCR o clonación de ADNc a partir de la fuente (clona de hibridoma), y separar en una secuencia que codifica una región constante humana deseada para codificar un anticuerpo de secuencia humana más conveniente para uso terapéutico humano.

E4. Anticuerpos Humanizados

Los anticuerpos humanos generalmente tienen cuando menos tres ventajas potenciales para su uso en la terapia humana. Primero, debido a que la porción efectora es humana, puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmune humano, por ejemplo, para destruir células diana más eficientemente por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (CCDA). Segundo, el sistema inmune humano no deberá reconocer el anticuerpo como extraño. Tercero, la semivida en la circulación humana será similar a los anticuerpos humanos que se presentan naturalmente, permitiendo que se den dosis más pequeñas y menos frecuentes.

En la presente invención se proporcionan diversos métodos para preparar anti-VEGF. Además de los anticuerpos humanos, los anticuerpos "humanizados" tienen muchas ventajas. Los anticuerpos "humanizados" generalmente son anticuerpos monoclonales quiméricos o mutantes de ratón, rata, hámster, conejo u otras especies, que llevan dominios de regiones variables y/o constantes humanas o cambios específicos. Las técnicas para generar un anticuerpo antiVEGF denominado "humanizado" son muy conocidas para los expertos en la técnica.

Los anticuerpos humanizados también comparten las siguientes ventajas. Primero, la porción efectora todavía es humana. Segundo, el sistema inmune humano no deberá reconocer la estructura o región constante como extraña, y por lo tanto, la respuesta de anticuerpo contra este anticuerpo inyectado deberá ser menor que contra un anticuerpo de ratón extraño totalmente. Tercero, los anticuerpos humanizados inyectados, en oposición con los anticuerpos de ratón inyectados, presumiblemente tendrán una semivida más similar a los anticuerpos humanos que se presentan naturalmente, permitiendo también dosis más pequeñas y menos frecuentes.

Varios métodos se han descrito para producir anticuerpos humanizados. El reordenamiento controlado de dominios de anticuerpos unidos a través de unión s de disulfuro de proteínas para formar moléculas de proteínas nuevas, artificiales, o anticuerpos "quiméricos" se pueden utilizar (Konieczny y colaboradores, 1981). La tecnología de ADN recombinante también se puede usar para construir fusiones de genes entre las secuencias de ADN que codifican dominios de cadenas ligeras y pesadas variables de anticuerpos de ratón y dominios constantes de cadenas y ligeras de pesadas de anticuerpos humanos (Morrison y colaboradores, 1984).

Las secuencias de ADN que codifican las porciones de unión de antígeno o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos monoclonales murinos se pueden injertar mediante medios moleculares en las secuencias de que codifican las estructuras de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos humanos (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988). Los productos recombinantes expresados se denominan anticuerpos humanizados o "reformados" y comprenden la región marco conservada de una cadena ligera o pesada de anticuerpos humanos y las porciones de reconocimiento de antígenos, CDR, de un anticuerpo monoclonal murino.
Otro método para producir anticuerpos humanizados se describe en la Patente US 5,639,641. El método proporciona, a través de la aparición en la superficie, anticuerpos de roedores humanizados que tienen eficacia terapéutica mejorada debido a la presentación de una superficie humana en la región variable. En el método: (1) se generan alineaciones de posiciones de un grupo de regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos para dar un conjunto de porciones expuestas en la superficie de la región marco conservada variable de cadena pesada y ligera, donde las posiciones de alineación para todas las regiones variables son cuando menos 98% aproximadamente idénticas; (2)se define un conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de la región marco conservada variable de cadena pesada y ligera para un anticuerpo de roedor (ó fragmento del mismo); (3) se identifica un conjunto de restos de aminoácidos expuestos en superficie de la estructura de la región variable de cadena pesada y ligera que es casi idéntica al conjunto de restos de aminoácidos expuestos en superficie del roedor; (4) el conjunto de restos de aminoácidos expuestos en superficie de la estructura de la región variable de cadena pesada y ligera definidos en la etapa (2) se sustituye con el conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de la regiónarco conservada variable de cadena pesada y ligera identificada en la etapa (3), excepto para los restos de aminoácidos que están dentro de 5Å de cualquier átomo de cualquier resto en las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo de roedor; y (5) se produce el anticuerpo de roedor humanizado que tiene especificidad de unión.

Un método similar para la producción de anticuerpos humanizados se describe en las Patentes US 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089 y 5,530,101. Estos métodos implican producir inmunoglobulinas humanizadas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y posibles aminoácidos adicionales de una inmunoglobulina donante y una región marco conservada de una inmunoglobulina humana receptora. Cada cadena de inmunoglobulina humanizada usualmente comprende, además de la región determinante de la complementariedad, aminoácidos de la estructura de inmunoglobulina donante que son capaces de interaccionar con las CDR para efectuar afinidad de unión, tales como uno o más aminoácidos que están inmediatamente adyacentes a una CDR en la inmunoglobulina donante o aquéllas dentro de aproximadamente 3Å predichas por modelación molecular. Las cadenas pesada y ligera se pueden diseñar usando cualquiera, o cualquier combinación, o todos los criterios de posición distintos descritos en las Patentes US 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089 y 5,530, 101. Cuando se combinan en un anticuerpo intacto, las inmunoglobulinas humanizadas son sustancialmente no inmunogénicas en seres humanos y conservan sustancialmente la misma afinidad que la inmunoglobulina donante al antígeno original.

Un método adicional para producir anticuerpos humanizados se describe en las Patentes US 5,565,332 y 5,733,743. Este método combina el concepto de anticuerpos humanizantes con las bibliotecas de fagémidos también descritas en detalle en la presente memoria. En un sentido general, el método utiliza secuencias del sitio de unión de antígenos de un anticuerpo o población de anticuerpos dirigidos contra un antígeno de interés. De este modo para un solo anticuerpo de roedor, las secuencias que comprenden parte del sitio de unión del antígeno del anticuerpo se pueden combinar con diversos repertorios de secuencias de anticuerpos humanos que pueden, en combinación, crear un sitio de unión de antígeno completo.

Los sitios de unión a antígeno creados por este proceso difieren de los creados por injerto en CDR, porque solamente la porción de secuencias del anticuerpo de roedor original es probable que haga contactos con el antígeno de una manera similar. Las secuencias humanas seleccionadas probablemente difieren en secuencia y hacen contactos alternativos con el antígeno de aquellos del sitio de unión original. Sin embargo, las restricciones impuestas por el enlace de la porción de la secuencia original al antígeno y las formas del antígeno y sus sitios de unión de antígeno, probablemente conduzcan a nuevos contactos de las secuencias humanas con la misma región o epítope del antígeno. Este proceso por lo tanto se ha denominado "selección impresa de epítope" (SIE).

Comenzando con un anticuerpo animal, un proceso da como resultado la selección de anticuerpos que son anticuerpos parcialmente humanos. Estos anticuerpos pueden ser suficientemente similares en secuencia a los anticuerpos humanos que se van a usar directamente en terapia o después de la alteración de algunos restos clave. Las diferencias de secuencia entre el componente roedor del anticuerpo seleccionado con las secuencias humanas podría minimizarse reemplazando aquellos restos que difieren con los restos de secuencias humanas, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio de restos individuales, o por injerto en CDR de ciclos enteros. Sin embargo, los anticuerpos con secuencias enteramente humanas también se pueden crear. La selección impresa de epítopes por lo

tanto ofrece un método para hacer anticuerpos parcialmente humanos o enteramente humanos que se unen al mismo epítope que el animal o al mismo epítope que los anticuerpos animales o parcialmente humanos, respectivamente. En la SIE, los repertorios de fragmentos de anticuerpos se pueden desplegar en la superficie de la fase filamentos y los genes que codifican fragmentos con actividades de unión de antígenos seleccionados por la unión del fago con el antígeno.

Métodos adicionales para humanizar anticuerpos contemplados para su uso en la presente invención se describen en las Patentes US Nos 5,750,078; 5,502,167; 5,705,154; 5,770,403; 5,698,417; 5,693,493; 5,558,864; 4,935,496 y 4,816,567.

E5. Mutagénesis por PCR™

La mutagénesis específica del sitio es una técnica útil en la preparación de anticuerpos individuales a través de mutagénesis específica del ADN subyacente. La técnica además proporciona una capacidad lista para preparar y variantes de secuencia de prueba, que incorporan una o más de las siguientes consideraciones, ya sea humanizando o no, introduciendo uno o más cambios de secuencias de nucleótidos en el ADN.

Aunque muchos métodos son convenientes para su uso en mutagénesis, el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR™) se prefiere generalmente. Esta tecnología ofrece un método rápido y eficiente para introducir las mutaciones deseadas en una secuencia de ADN dada. El siguiente texto particularmente describe el uso de PCR™ para introducir mutaciones puntuales en una secuencia, como se puede usar para cambiar el aminoácido codificado por la secuencia dada. Las adaptaciones de este método también son convenientes para introducir sitios de enzimas de restricción en una molécula de ADN.

En este método, los oligonucleótidos sintéticos se diseñan para incorporar una mutación puntual en un extremo de un segmento amplificado. Después de PCR™, los fragmentos amplificados se hacen romos el extremo tratándolos con fragmentos de Klenow, y después los fragmentos con extremo romo se ligan y se subclonan en un vector para facilitar el análisis de la secuencia.

Para preparar el molde de ADN que se desea mutagenizar, el ADN se subclona en un vector de alto número de copias, tal como pUC19, usando sitios de restricción que flanquean las áreas que se van a mutar. El ADN molde se prepara después usando una minipreparación de plásmido. Los cebadores de oligonucleótidos adecuados que se basan en la secuencia parental, pero que contienen la mutación puntual deseada y que están flanqueados en el extremo 5' por un sitio de enzima de restricción, se sintetizan usando un sintetizador automatizado. Generalmente se requiere que el cebador sea homólogo al ADN molde en aproximadamente 15 bases más o menos. Los cebadores se pueden purificar mediante electroforesis de gel de poliacrilamida desnaturalizante, aunque esto no es absolutamente necesario para su uso en la PCR. El extremo 5' de los oligonucleótidos deberán entonces fosforilarse.

El ADN molde deberá ser amplificado por PCR™, usando los cebadores de oligonucleótidos que contienen las mutaciones puntuales deseadas. La concentración de MgCl2 en el regulador de amplificación generalmente será de aproximadamente 15 mM. Generalmente, aproximadamente 20-25 ciclos de PCR™ deberá llevarse a cabo de la siguiente manera: desnaturalización, 35 segundos a 95°C; hibridación, 2 minutos a 50°C; y extensión, 2 minutos a 72°C. La PCR™ generalmente incluirá un último ciclo de extensión de aproximadamente 10 minutos a 72°C. Después de la etapa de extensión final, aproximadamente 5 unidades de fragmentos de Klenow deberán añadirse a la mezcla de la reacción e incubarse durante otros 15 minutos a aproximadamente 30°C. La actividad exonucleasa de los fragmentos de Klenow se requiere para hacer que los extremos se laven y conveniente para clonación de extremo romo.

La mezcla de la reacción resultante generalmente deberá ser analizada por electroforesis en gel de acrilamida o agarosa no desnaturalizante para verificar que la amplificación ha producido el producto predicho. Luego se procesaría la mezcla de la reacción eliminando la mayoría de los aceites minerales, extrayendo con cloroformo para eliminar el aceite restante, extrayendo con fenol regulado y luego concentrando mediante precipitación con 100 por ciento de etanol. Enseguida, se digeriría aproximadamente la mitad de los fragmentos amplificados con una enzima de restricción que corta en las secuencias flanqueantes usadas en los oligonucleótidos. Los fragmentos digeridos se purifican en un gel de agarosa de baja gelificación/fusión.

Para subclonar los fragmentos y verificar la mutación puntual, se subclonarían los dos fragmentos amplificados en un vector adecuadamente digerido por ligación de extremo romo. Esto se usaría para transformar *E. coli*, a partir de la cual el ADN del plásmido posteriormente podría prepararse usando una minipreparación. La porción amplificada del ADN de plásmido se analizaría entonces mediante secuenciación de ADN para confirmar que se generó la mutación puntual correcta. Esto es importante, ya que la polimerasa de ADN Taq puede introducir mutaciones adicionales en los fragmentos de ADN.

La introducción de una mutación puntual también se puede efectuar usando etapas secuenciales de PCR™. En este procedimiento, los dos fragmentos que abarcan la mutación se hibridan entre sí y se extienden mediante síntesis mutuamente cebada. Este fragmento se amplifica después mediante una segunda etapa de PCR™, impidiendo así el

ligamiento del extremo romo requerido en el protocolo anterior. En este método, la preparación del molde de ADN, la generación de los cebadores de oligonucleótidos y la primera amplificación de de PCR™ se realizan como se describió anteriormente. Sin embargo, en este proceso los oligonucleótidos elegidos deberán ser homólogos al ADN molde en un tramo de aproximadamente entre 15 y aproximadamente 20 bases, y también deberá solaparse entre sí en aproximadamente 10 bases o más.

En la segunda amplificación por PCR™, se usaría cada fragmento amplificado y cada cebador de secuencia flanqueante y se realizaría la PCR durante entre aproximadamente 20 y aproximadamente 25 ciclos, usando las condiciones descritas anteriormente. De nuevo se subclonarían los fragmentos y se verificaría que la mutación puntual fue correcta usando las etapas indicadas anteriormente.

Al usar cualquier método anterior, se prefiere generalmente introducir la mutación amplificando un fragmento tan pequeño como sea posible. Desde luego, parámetros tales como la temperatura de fusión del oligonucleótido, como generalmente será influenciado por el contenido de GC y la longitud del oligo, deberán considerarse cuidadosamente. La ejecución de estos métodos, y su optimización, si es necesario, será conocida para los expertos en la técnica, y se describirá adicionalmente en distintas publicaciones, tales como Current Protocols in Molecular Biology, 1995, incorporada en la presente memoria como referencia.

Cuando se realiza mutagénesis específica del sitio, se puede emplear la Tabla A como una referencia.

TABLA A

Aminoácidos			Codones					
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU				
Acido aspártico	Asp	D	GAC	GAU				
Acido glutámico	Glu	E	GAA	GAG				
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU				
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	His	H	CAC	CAU				
Isoleucina		Ile	I	AUA	AUC	AUU		
Lisina	Lys	K	AAA	AAG				
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Metionina		Met	M	AUG				
Asparagina		Asn	N	AAC	AAU			
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamina		Gln	Q	CAA	CAG			
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina		Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU	
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Triptófano		Trp	W	UGG				
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU				

E6. Fragmentos y derivados de anticuerpos

Independientemente de la fuente del anticuerpo original contra un fosfolípido aniónico o aminofosfolípido, ya sea el anticuerpo intacto, multímeros del anticuerpo, o cualquiera de una variedad de regiones de unión de antígeno funcionales del anticuerpo se puede usar en la presente invención. Las regiones funcionales ejemplares incluyen fragmentos scFv, Fv, Fab', Fab y $F(ab')_2$ de los anticuerpos anti-VEGF. Las técnicas para preparar estas construcciones son muy conocidas para los expertos en la técnica y se ilustran adicionalmente en la presente memoria.

La elección de la construcción de anticuerpo puede estar influenciada por varios factores. Por ejemplo, la semivida prolongada puede ser resultado de la reabsorción activa de anticuerpos intactos dentro del riñón, una propiedad de la pieza Fc de la inmunoglobulina. Los anticuerpos basados en IgG, por lo tanto, se espera que exhiban una eliminación en la sangre más lento que sus contrapartes Fab'. Sin embargo, las composiciones basadas en fragmentos Fab' generalmente exhibirán una capacidad mejor de penetración de tejido.

Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener mediante la proteólisis de la inmunoglobulina entera mediante la tiol proteasa no específica, papaína. La digestión de papaína produce dos fragmentos de unión de antígeno idénticos, denominados "fragmentos Fab", cada uno con un solo sitio de unión de antígeno, y un "fragmento Fc" residual.

La papaína primero se debe activar reduciendo el grupo sulfhidrilo en el sitio activo con cisteína, 2-mercaptoetanol o ditiotreitol. Los metales pesados en la enzima de material podrían eliminarse mediante quelación con AEDT (2 mM) para asegurar la máxima actividad de enzima. La enzima y el sustrato normalmente se mezclan entre sí en una proporción de 1:100 en peso. Después de la incubación, la reacción se puede detener mediante alquilación irreversible del grupo tiol con yodoacetamida o simplemente mediante diálisis. Deberá supervisarse la finalización de la digestión mediante SDS-PAGE y las fracciones distintas separarse mediante cromatografía por intercambio de iones o proteína A Sefarosa.

El procedimiento usual para la preparación de fragmentos $F(ab')_2$ a partir de IgG de origen de conejo y humano se limita a la proteólisis mediante la enzima pepsina. Las condiciones, 100 veces exceso de anticuerpo peso/peso en tampón de acetato con pH 4,5, a 37°C, sugiere que el anticuerpo se disocia en el lado de la terminal C del enlace disulfuro de la cadena interpesada. Las tasas de digestión de la IgG de ratón pueden variar con la subclase y puede ser difícil obtener rendimientos altos de los fragmentos de F(ab')2 activos con algo de IgG no digerida o completamente degradada. En particular, IgG_{2b} es susceptible a la degradación completa. Las otras subclases requieren diferentes condiciones de incubación para producir resultados óptimos, todo lo cual se conoce en la técnica.
El tratamiento de pepsina de anticuerpos intactos produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación de antígenos y todavía es capaz de reticular antígeno. La digestión de IgG de rata por pepsina requiere condiciones que incluyen diálisis en 0.1 M de tampón de acetato, pH 4.5, y luego incubación durante cuatro horas con 1 por ciento peso/peso de pepsina; la digestión de IgGi e IgG_{2a} se mejora si primero se dializa contra 0.1 M de tampón de formato, pH 2.8, a 4°C, durante 16 horas seguido de tampón de acetato. IgG_{2b} da resultados más consistentes con la incubación en proteasa V8 de estafilococos (3% peso/peso) en 0.1 M de tampón de fosfato de sodio, pH 7.8, durante cuatro horas a 37°C.

Un fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el término carboxilo de la cadena pesada del dominio CH1 incluyendo una o más cisteínas de la región de articulación del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ originalmente se produjeron como pares de fragmento Fab' que tenían cisteínas de articulación entre ellos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo también se conocen.

Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un reconocimiento de antígeno completo y sitio de unión. Esta región consiste en un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación con covalente estrecha. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión de antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión de antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aún un dominio variable simple (o la mitad de un fragmento Fv que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir el antígeno, aunque a una afinidad más baja que el sitio de unión entero.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena simple" o "sFv" (también conocidos como "cadenas simples" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptidos. Generalmente, el polipéptido Fv además comprende un enlazador de polipéptido entre los dominios de V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión del antígeno.

Las siguientes patentes complementan aún más las presentes enseñanzas con respecto a la preparación y uso de regiones de unión de antígeno de anticuerpos, incluyendo scFv, Fv, Fab', Fab y los fragmentos $F(ab')_2$ de los anticuerpos anti-VEGF: Patentes US Nos 5,855,866; 5,877,289; 5,965,132; 6,093,399; 6,261,535 y 6,004,555. El documento WO 98/45331 incluye además la descripción y explicación de la preparación de regiones variables, hipervariables y determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos. Además, la producción exitosa de construcciones scFv dentro del alcance de la invención se detalla en el ejemplo XIV.

"Diacuerpos" son pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión de antígeno, estos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio de variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H-V_L). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareo entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión de antígeno. Los diacuerpos se describen en la Patente EP 404,097 y la WO 93/11161, cada una específicamente incorporada en la presente memoria como referencia. Los "anticuerpos lineales" que pueden ser biespecíficos o monoespecíficos, comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_H 1-V_H-C_H1) que forman un par de regiones de unión de antígeno, como describen Zapata y colaboradores, (1995).

Al usar un Fab' o fragmento de unión de antígeno en el anticuerpo, con los beneficios esperados de la penetración de tejido, se pueden derivar ventajas adicionales de modificar el fragmento para aumentar su semivida. Una variedad de técnicas se puede emplear, tales como la manipulación o modificación de la molécula de anticuerpo misma, y también la conjugación con transportadores inertes. Cualquier conjugación para el único propósito de aumentar la semivida, en vez de administrar una sustancia a un objetivo, deberá ser llevada a cabo cuidadosamente porque el Fab' y otros

fragmentos se seleccionan para penetrar tejidos. Sin embargo se contempla la conjugación con polímeros que no son proteínas, tales como PEG y similares.

Las modificaciones distintas de la conjugación por lo tanto se basan en modificar la estructura del fragmento de anticuerpo para volverlo más estable, y/o reducir la tasa de catabolismo en el cuerpo. Un mecanismo para estas modificaciones es el uso de D aminoácidos en lugar de L aminoácidos. Las personas con experiencia ordinaria en la técnica entenderán que la introducción de estas modificaciones necesita seguirse mediante la prueba rigurosa de la molécula resultante para asegurar que todavía retiene las propiedades biológicas deseables. Otras modificaciones de estabilización incluyen el uso de fracciones de adición o de estabilización ya sea en la terminal N o en la terminal C o ambas, lo cual generalmente se usa para prolongar la semivida de las moléculas biológicas. A manera de ejemplo solamente, se puede desear modificar los términos mediante acilación o aminación.

Las modificaciones tipo conjugación moderada para su uso en la presente invención incluyen incorporar un epítope de unión receptor de recuperación en el fragmento de anticuerpo. Las técnicas para lograr esto incluyen la mutación de la región adecuada del fragmento de anticuerpo o incorporar el epítope como un marcador de péptido que se une al fragmento de anticuerpo. El documento WO 96/32478 se incorpora específicamente en la presente memoria como referencia para los propósitos de ilustrar adicionalmente esta tecnología. Los epítopes de unión receptor recuperados típicamente son regiones de tres o más aminoácidos de uno o dos ciclos del dominio Fc que se transfieren a la posición análoga del fragmento de anticuerpo. El receptor de recuperación que se une con epítopes del documento WO 98/45331 se incorpora en la presente memoria como referencia para su uso con la presente invención.

F. Unión de Inmunoconjugados a Fosfolípidos Aniónicos y Aminofosfolípidos

Los inventores de la presente memoria desarrollaron antes una serie de inmunoconjugados que se unen a aminofosfolípidos para el uso en la localización dirigida a la vasculatura de los tumores (patente US 6,312,694). Estos agentes usan proteínas de unión a los aminofosfolípidos, tales como anexinas y cininógenos y anticuerpos contra aminofosfolípidos, tales como FS y FE, para suministrar agentes terapéuticos unidos, al tumor y a la vasculatura intratumoral. La invención proporciona ahora anticuerpos anti-FS seleccionados, con propiedades mejoradas, tales como 3G4 (ATCC 4545) y 9D2, y estos anticuerpos así como anticuerpos competidores pueden ser usados ahora como las porciones de anticuerpos de inmunoconjugados.

Además del uso de agentes para la localización dirigida vascular, que se enlacen a aminofosfolípidos (patente US 6,312,694), el presente descubrimiento de que los fosfolípidos aniónicos, así como los aminofosfolípidos, son entidades estables y a las que se puede llegar con localización dirigida, dentro de la vasculatura del tumor, permite el uso de un rango de nuevos agentes de localización dirigida vascular de los tumores. Los nuevos compuestos, no sugeridos en el trabajo previo, enfocado a los aminofosfolípidos, usan anticuerpos dirigidos contra fosfolípidos aniónicos para suministrar toxinas, citocinas, coagulantes y otros agentes terapéuticos, a fosfolípidos aniónicos regulados positivamente en la vasculatura tumoral e intratumoral. Como se detalló anteriormente con respecto a los anticuerpos desnudos, el desarrollo de estos aspectos de la invención requirió de la generación de herramientas biológicas, particularmente anticuerpos, con exquisita especificidad para diferentes fosfolípidos, fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos.

Como la presente invención muestra que los fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, tales como FS , PE, FI, AF y FG , y más particularmente FS y FE, son dianas seguras y eficaces para la terapia antiviral, los anticuerpos y péptidos que se unen a estos componentes, particularmente FS y FE, pueden relacionarse ahora ventajosamente a una serie de agentes antivirales conocidos. Estos conjugados antivirales incluyen conjugados tanto a base de péptidos como a base de anticuerpos, pudiendo estos últimos de los cuales denominarse inmunoconjugados antivirales o "inmunovirocidas".

En estos aspectos de la invención, cualquier anticuerpo contra un fosfolípido aniónico puede ser usado para preparar un inmunoconjugado o coaguligando, con anticuerpos tales como los anticuerpos de segunda generación, particularmente anticuerpos tipo 9D2 y anticuerpos tipo 3G4, se prefieren sus perfiles ventajosos de unión a los fosfolípidos aniónicos. Los agentes para el uso en esos inmunoconjugados incluyen preferentemente agentes anticelulares o citotóxicos, coagulantes (factores de coagulación), citocinas, agentes radioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de la apoptosis, fármacos antitubulina y agentes antivirales (y los péptidos de unión a la FE, tales como los derivados de duramicina, como se describe con detalle en la presente memoria). En los inmunoconjugados antivirales no hay requerimiento de usar un anticuerpo de segunda generación como se describe en la presente memoria, aunque estos pueden ser empleados. Cualquier anticuerpo para los aminofosfolípidos o fosfolípidos aniónicos puede ser enlazado entonces a un agente antiviral para formar inmunoconjugados antivirales o inmunovirocidas, de conformidad con la invención.

F1. Agentes Citotóxicos y Anticelulares

Para ciertas aplicaciones, los agentes terapéuticos serán agentes citotóxicos o farmacológicos, particularmente agentes citotóxicos, citostáticos, o de otro modo anticelulares que tienen la capacidad de aniquilar o suprimir el crecimiento de la división celular de las células, particularmente de las células endoteliales de tumores o de células

tumorales. En general, estos aspectos de la invención contemplan el uso de cualquier sustancia farmacológica que se pueda conjugar con un anticuerpo contra un fosfolípido aniónico, preferentemente un anticuerpo basado en el 9D2 o un anticuerpo basado en el 3G4 y administrado en forma activa al endotelio diana.

Los agentes anticelulares ejemplares incluyen agentes quimioterapéuticos, así como citotoxinas. Los agentes quimioterapéuticos que se pueden usar incluyen: hormonas, tales como esteroides; antimetabolitos, tales como arabinósido de citocina, fluorouracilo, metotrexato o aminopterina; antraciclinas; mitomicina C; alcaloides de la vinca; demecolcina; etopósido; mitramicina; sustancias alquilantes antitumorales, tales como clorambucilo o melfalán. Otras realizaciones pueden incluir sustancias tales como citocinas. Básicamente, cualquier agente anticelular se puede usar, en tanto pueda conjugarse con éxito a, o asociarse con, un anticuerpo de una manera que permitirá su direccionamiento, internalización, liberación y/o presentación a los componentes de sangre en el sitio de las células diana, tales como células endoteliales.

Puede haber circunstancias, tales como cuando el antígeno objetivo no se internaliza mediante una vía consistente con intoxicación eficiente mediante el compuesto tóxico, en donde se deseará dirigir sustancias quimioterapéuticas, tales como fármacos antitumorales, citocinas, antimetabolitos, agentes alquilantes, hormonas, y similares. Una variedad de agentes quimioterapéuticos y otros agentes farmacológicos ahora se han conjugado con éxito con anticuerpos si muestran que funcionan farmacológicamente, incluyendo la doxorrubicina, daunomicina, metotrexato, vinblastina, neocarcinostatina, macromicina, trenimón y α-amanitina.

En otras circunstancias, cualquier efecto secundario potencial de la terapia basada en citotoxina se puede eliminar mediante el uso de inhibidores de síntesis de ADN, tales como la daunorrubicina, doxorrubicina, adriamicina, y similares. Estas sustancias por lo tanto son ejemplos preferidos de sustancias anticelulares para su uso en la presente invención. En términos de agentes citostáticos, estos compuestos generalmente interrumpen el ciclo natural de las células de una célula diana, preferiblemente de manera que la célula se salga del ciclo de la célula.

Una variedad amplia de agente citotóxico se sabe que se puede conjugar con un anticuerpo contra un fosfolípido aniónico, preferentemente un anticuerpo basado en 9D2 o basado en 3G4. Ejemplos incluyen numerosas toxinas derivadas de plantas, hongos o bacterias, las cuales, a manera de ejemplo, incluyen varias toxinas de cadena A, particularmente cadena de ricina A; proteína de inactivación de ribosoma, tales como saporín o gelonina; α-sarcina; aspergilina; restrictocina; ribonucleasas, tales como ribonucleasa placentaria; toxina de difteria; y exotoxina de pseudomonas, sólo por nombrar algunas.

De las toxinas, se prefiere el uso de las cadenas de gelonina y ricina A. El uso de gelonina como la porción efectora o de toxina de inmunoconjugados que se unen a los marcadores expresados, que tienen acceso a la unión, se absorbieron o localizaron en vasos sanguíneos intratumorales de un tumor vascularizado, se describe en la patente US 6,051,230, incorporada específicamente en la presente memoria como referencia y en la patente US 6,451,312, la cual concierne particularmente a la gelonina unida al VEGF como un agente de localización dirigida.

En cuanto a las cadenas de ricina A, una porción de toxina preferida, adicional, es la cadena de toxina A que ha sido tratada para modificar o eliminar restos de carbohidratos, denominados cadena A desglucosilada (dgA). La cadena de ricina A desglucosilada se prefiere debido a su extrema potencia, semivida más prolongada, y debido a que es económicamente factible fabricarla a grado y escala clínica.

Puede ser deseable desde un punto de vista farmacológico emplear la molécula más pequeña posible que sin embargo proporcione una respuesta biológica adecuada. Se puede desear emplear péptidos de cadena A más pequeños que proporcionarán una respuesta anticelular adecuada. Con este fin, se ha descubierto que la cadena de ricina A se puede "truncar" mediante la remoción de 30 aminoácidos N-terminales por Nagarase (Sigma), y todavía retener una actividad de toxina adecuada. Se propone que cuando se desea, esta cadena A truncada se puede emplear en conjugados de acuerdo con la invención.

De manera alternativa, se puede encontrar que la aplicación de la tecnología de ADN recombinante a la fracción de cadena A de toxina proporcionará beneficios adicionales de acuerdo con la invención. Para que la clonación y expresión de la cadena A de ricina activa biológicamente se haya logrado, ahora es posible identificar y preparar péptidos más pequeños o de otro modo variantes que sin embargo exhiben una actividad de toxina adecuada. Más aún, el hecho de que la cadena de ricina A ahora haya sido clonada permite la aplicación de mutagénesis dirigida al sitio, a través de lo cual se puede preparar fácilmente y seleccionar péptidos derivados de la cadena A y obtener fracciones útiles adicionales para su uso en relación con la presente invención.

F2. Citocinas

Las citocinas y las quimiocinas son ejemplos particulares de agentes para la unión a los anticuerpos de la invención. Se puede usar cierto intervalo de citocinas, incluyendo IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL- 13, TGF-β, M-CSF, G-CSF, TNFβ, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, IFN-α, IFN-β. Las citocinas más preferidas incluyen IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFNγ, la proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), el factor

de crecimiento BB derivado de plaquetas (PDGF-BB) y la proteína C-reactiva (CRP) y similares. Ejemplos particularmente preferidos son TNFα, inductores de TNFα e IL-12.

El TNFα incrementa la permeabilidad vascular. Este agente se contempla para la unión a un anticuerpo de la invención, particularmente en donde se usa el inmunoconjugado resultante en terapia de combinación para el tratamiento del cáncer. El anticuerpo entregará el TNFα unido, al ambiente del tumor, y la causa de la permeabilidad aumentada en el tumor facilitará la penetración de un segundo agente anticanceroso al tumor, amplificando de esta manera el efecto antitumoral global. Las construcciones scFv son contemplados particularmente para el uso en esas realizaciones. Esto se debe parcialmente porque el TNFα funciona como un trímero y las construcciones de scFv podrán trimerizarse fácilmente.

La IL-12, por ejemplo, puede unirse a un anticuerpo y usarse para redirigir las defensas del huésped a atacar los vasos del tumor. Al usar el IL-12, se puede preferir una forma de scFv de región de unión al antígeno. La quimiocina LEC (quimiocina expresada por el hígado, conocida también como NCC-4, HCC-4 o LMC) es otro componente preferido (Giovarelli *et al.*, 2000). La LEC es quimiotáctica para células dendríticas, monocitos, células T, células NK y neutrófilos y puede mejorar entonces las respuestas antitumorales mediadas por el huésped.

F3. Factores de Coagulación

Un anticuerpo contra un fosfolípido aniónico, o un anticuerpo de segunda generación en base a los anticuerpos 9D2 y 3G4 preferidos (ATCC 4545) de la invención, se pueden unir a un componente que es capaz de estimular directamente o indirectamente la coagulación, para formar un coaguligando. Las patentes US Nos 6,093,399, 6,004,555, 5,877,289 describen adicionalmente la asociación funcional de coagulantes con anticuerpos para formar coaguligandos.

Los anticuerpos de la invención se pueden unir directamente al coagulante o al factor de coagulación, o se pueden unir a una segunda región unión que une y después libera el coagulante o el factor de coagulación. Como se usa en la presente memoria, los términos "coagulante" y "factor de coagulación" cada uno se usa para referirse a un componente que es capaz de estimular directamente o indirectamente la coagulación en condiciones adecuadas, preferiblemente cuando se proporciona a un ambiente específico en vivo, tal como la vasculatura del tumor.

Los factores de coagulación preferidos son las composiciones de Factor Tisular, tales como el Factor Tisular truncado (tTF), las moléculas de Factor Tisular diméricas, multiméricas y mutantes. El "Factor Tisular Truncado" (tTF) se refiere a construcciones de Factor Tisular que se vuelven deficientes del enlace con la membrana por la remoción de suficientes secuencias de aminoácidos para efectuar este cambio en propiedad. Una "cantidad suficiente" en este contexto es una cantidad de secuencia de aminoácidos de transmembrana originalmente suficiente para introducir la molécula del Factor Tisular en la membrana, o de otro modo mediar el enlace de la membrana funcional de la proteína del Factor Tisular. La remoción de esta "cantidad suficiente de secuencia de extensión de la transmembrana" por lo tanto crea una proteína o polipéptido de Factor Tisular deficiente en capacidad de unión con la membrana de fosfolípidos, de manera que la proteína es sustancialmente una proteína soluble que no se une significativamente a las membranas de fosfolípidos. El Factor Tisular truncado de este modo sustancialmente falla en convertir el Factor VII en Factor VIIa en un ensayo de Factor Tisular estándar, y todavía retiene la denominada actividad catalítica que incluye la activación del Factor X en presencia del Factor VIIa.

Las Patentes US Nos 5,504,067, 6,156,321, 6,156,729 y 6,132,730 describenadicionalmente estas proteínas de Factor Tisular truncado. Preferiblemente, los Factores Tisulares para su uso en estos aspectos de la presente invención generalmente carecen de la transmembrana y regiones citosólicas (aminoácidos 220-263) de la proteína. Sin embargo, no hay necesidad de que las moléculas del Factor Tisular truncado se limiten a moléculas de la longitud exacta de 219 aminoácidos.

Las composiciones de Factor Tisular también pueden ser útiles como dímeros. Cualquiera de las construcciones de Factor Tisular truncadas, mutadas u otras se pueden preparar en una forma dimérica para su uso en la presente invención. Como será conocido para los expertos en la técnica, estos dímeros de Factor Tisular se pueden preparar empleando las técnicas estándares de la biología molecular y la expresión recombinante, en las cuales dos regiones de codificación se preparan dentro del marco y se expresan a partir de un vector de expresión. Igualmente, se pueden emplear varias tecnologías de conjugación química en relación con la preparación de dímeros del Factor Tisular. Los monómeros del Factor Tisular individuales se pueden derivar antes de la conjugación. Todas estas técnicas serían fácilmente conocidas por los expertos en la técnica.

Si se desea, los dímeros o multímeros del Factor Tisular se pueden unir vía un enlace biológicamente liberable, tal como un enlazador selectivamente escindible o una secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, los enlazadores peptídicos que incluyen un sitio de escisión para una enzima preferencialmente localizada o activa dentro de un ambiente de tumor se contemplan. Formas ejemplares de estos enlazadores peptídicos son aquellos que se disocian mediante urocinasa, plasmina, trombina, Factor IXa, Factor Xa, o una metaloproteinasa, tal como colagenasa, gelatinasa o estromelisina.

En ciertas realizaciones, los dímeros del Factor Tisular además pueden comprender una fracción de inserción de membrana hidrofóbica impedida, para alentar posteriormente la asociación funcional del Factor Tisular con la membrana de fosfolípidos, pero solamente en ciertas condiciones definidas. Como se describe en el contexto de los Factores de Tejido truncados, las secuencias de asociación de membrana hidrofóbica generalmente son tramos de aminoácidos que promueven la asociación con el ambiente de fosfolípidos debido a su naturaleza hidrofóbica. Igualmente, se pueden usar ácidos grasos para proporcionar la fracción de inserción de membrana potencial.

Estas secuencias de inserción de membrana se pueden localizar ya sea en el término N o el término C de la molécula de Factor Tisular, o generalmente anexar en cualquier otro punto de la molécula en tanto su unión a la misma no impida las propiedades funcionales de la construcción del Factor Tisular. El intento de la fracción de inserción impedida es que permanezca no funcional hasta que el construcción del Factor Tisular se localice dentro del ambiente del tumor, y permita que la unión hidrofóbica se vuelva accesible y hasta además promueva la asociación física con la membrana. De nuevo, se contempla que los enlaces biológicamente liberables y las secuencias selectivamente escindibles serán particularmente útiles con respecto a esto, disociándose solamente el enlace o la secuencia o, de otro modo, modificándose después de la localización dentro del ambiente del tumor y la expresión a enzimas particulares u otras moléculas bioactivas.

En otras realizaciones, las construcciones de tTF pueden ser multiméricas o poliméricas. En este contexto una "construcción polimérica" contiene 3 o más construcciones de Factor Tisular. Una "construcción de TF multimérica o polimérica" es una construcción que comprende una primera molécula de TF o un derivado unido a al menos una segunda y una tercera molécula de TF o derivada. Los multímeros pueden comprender entre aproximadamente 3 y aproximadamente 20 de estas moléculas de TF. Las unidades individuales de TF dentro de los multímeros o polímeros pueden también estar unidas por enlazadores peptídicos selectivamente escindibles u otros enlaces biológicamente liberables como se desea. De nuevo, como con los dímeros de TF discutidos anteriormente, las construcciones pueden fácilmente hacerse usando ya sea manipulación recombinante y expresión o usando química sintética estándar.

Todavía otras construcciones de TF útiles en el contexto de la presente invención son aquellos mutantes deficientes en la capacidad para activar el Factor VII. Estos "mutantes de activación de Factor VII" generalmente se definen en la presente memoria como mutantes del TF que se unen con el Factor VII/VIIa funcional, el Factor X proteolíticamente activo, pero están sustancialmente libres de la capacidad del Factor VII proteolíticamente activo. De acuerdo con lo anterior, estas construcciones son mutantes del TF que carecen de la actividad de la activación del Factor VII.

La capacidad de estos mutantes de activación del Factor VII para funcionar promoviendo la coagulación específica del tumor se basa en su administración específica a la vasculatura del tumor, y la presencia del Factor VIIa a niveles bajos en el plasma. Después de la administración de este conjugado de sustancia objetivo-mutante de activación de Factor VII, el mutante se localizará dentro de la vasculatura de un tumor vascularizado. Antes de la localización, el mutante de Factor Tisular generalmente sería incapaz de promover la coagulación en ningún otro sitio del cuerpo, con base en su incapacidad para convertir el Factor VII en Factor VIIa. Sin embargo, después de la localización y acumulación dentro de la región del tumor, el mutante encontrará entonces suficiente Factor VIIa del plasma con el fin de iniciar la ruta de coagulación extrínseca, conduciendo a trombosis específica del tumor. El Factor VIIa exógeno podría también ser administrado al paciente.

Uno o más de una variedad de mutantes de activación del Factor VII se pueden preparar y usar en relación con la presente invención. Hay una cantidad significativa de conocimiento científico concerniente a los sitios de reconocimiento de la molécula de Factor Tisular para el Factor VII/VIIa. De este modo se entenderá que la región de activación del Factor VII generalmente yace entre aproximadamente el aminoácido 157 y aproximadamente el aminoácido 167 de la molécula del TF. Sin embargo, se contempla que los restos fuera de esta región también pueden demostrar ser relevantes a la actividad de activación del Factor VII, y por lo tanto se puede considerar introducir mutaciones en uno cualquiera o más de los restos generalmente localizados entre aproximadamente el aminoácido 106 y aproximadamente el aminoácido 209 de la secuencia del TF (WO 94/07515; WO 94/28017).

Como se detalla en las patentes US Nos 6,093,399,6,004, 555, 5,877,289 y 6,036,955, una variedad de otros factores de coagulación se pueden usar junto con la presente invención, como se ilustra por las sustancias presentadas más adelante. Trombina, Factor V/Va y derivados, Factor VIII/VIIIa y derivados, Factor IX/IXa y derivados, Factor X/Xa y derivados, Factor XI/XIa y derivados, Factor XII/XIIa y derivados, Factor XIII/XIIIa y derivados, Factor X activador y Factor V activador se pueden usar en la presente invención.

El activador del Factor X de veneno de víbora de Russell se contempla para su uso en esta invención. Los anticuerpos monoclonales específicos para el activador del Factor X presentes en el veneno de víbora de Russell también han sido producidos, y podrían ser usados para administrar específicamente la sustancia como parte de un ligando de unión biespecífico.

El tromboxano A_2 está formado de endoperóxidos mediante las acciones secuenciales de las enzimas ciclooxigenasa y tromboxano sintetasa en microsomas de plaquetas. El tromboxano A_2 es generado fácilmente por las plaquetas y es

un potente vasoconstrictor, en virtud de su capacidad para producir la agregación de las plaquetas. Tanto el tromboxano A2 como los análogos activos del mismo se contemplan para su uso en la presente invención.

La tromboxano sintasa, y otras enzimas que sintetizan las prostaglandinas de activación de plaquetas, también se pueden usar como "coagulantes" en el presente contexto. Los anticuerpos monoclonales, y la purificación por inmunoafinidad de, la tromboxano sintasa se conocen; como también el ADNc de la tromboxano sintasa humana.

La α2-antiplasmina, o el inhibidor de α2-plasmina, es un inhibidor de proteinasa naturalmente presente en el plasma humano que funciona para inhibir eficientemente la lisis de los coágulos de fibrina inducidos por el activador plasminógeno. La α2-antiplasmina es un inhibidor particularmente potente, y se contempla para su uso en la presente invención.

Conforme está disponible la secuencia de ADNc para la α2-antiplasmina, se prefieren las proteínas de expresión y/o fusión recombinantes.Los anticuerpos monoclonales contra la α2-antiplasmina también están disponibles que se pueden usar por las realizaciones de ligando de unión biespecífico de la invención. Estos anticuerpos podrían ser usados tanto para administrar α2-antiplasmina endógena a un sitio objetivo como para acumular α2-antiplasmina endógena y concentrarla dentro de la región diana.

F4. Fármacos antitubulina

Una gama de fármacos ejerce sus efectos vía la interferencia con la actividad de tubulina. Como las funciones de tubulina son esenciales para la mitosis y la viabilidad celular, ciertos "fármacos antitubulina" son sustancias quimioterapéuticas poderosas. Algunos de los fármacos antitubulina más conocidos y actualmente preferidos para su uso con la presente invención están la colchicina; taxanos, tales como taxol; alcaloides de la vinca, tales como vinblastina, vincristina y vindescina; y combretastatinas. Otros fármacos antitubulinas son las citocalasinas (incluyendo B, J, E), dolastatina, auristatina FE, paclitaxel, ustiloxin D, rizoxin, 1069C85, colcemid, albendazol, azatoxin y nocodazol.

Como se describe en las Patentes US Nos 5,892,069, 5,504, 074 y 5,661,143, las combretastatinas son derivados de estradiol que generalmente inhiben la mitosis celular. Las combretastatinas ejemplares que se pueden usar junto con la invención e incluyen aquellas basadas en combretastatina A, B y/o D y las descritas en las Patentes US Nos 5,892,069, 5,504,074 y 5,661,143. Las combretastatinas A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6, B-1, B-2, B-3 y B-4 son ejemplares de los tipos anteriores.

Las Patentes US Nos 5,569,786 y 5,409,953, describen el aislamiento, la caracterización estructural y la síntesis de cada una de las combretastatinas A-1, A-2, A-3, B-1, B-2, B-3 y B-4 y formulaciones y métodos para usar estas combretastatinas para tratar el crecimiento neoplásico. Cualquiera o más de estas combretastatinas se puede usar junto con la presente invención.

La combretastatina A-4, como se describe en las Patentes US Nos 5,892,069, 5,504,074, 5,661,143 y 4,996,237, también se puede usar con la misma. La Patente US 5,561,122 describe profármacos de combretastatina A-4 convenientes, que se contemplan para el uso combinado con la presente invención.

La Patente US No 4,940,726, describe particularmente lactonas macrocíclicas denominadas combretastatina D-1 y "Combretastatina D-2", cada una de las cuales se puede usar en combinación con las composiciones y métodos de la presente invención. La Patente US No 5,430,062, se refiere a derivados de estilbeno y a análogos de combretastatina con actividad anticancerosa que se pueden usar en combinación con la presente invención.

F5. Agentes AntiAngiogénicos

Los agentes antiangiogénicos son útiles para la unión de anticuerpos y péptidos de la invención. Muchos agentes anticancerosos tienen un efecto antiangiogénico como parte de su mecanismo de acción. Cualquiera o más de esos agentes descritos para el uso en terapias de combinación, incluyendo los de la Tabla E, pueden ser conjugados también a un anticuerpo de la invención, tal como se describe en la presente memoria. Ciertos otros agentes han sido descubiertos, diseñados o seleccionados para que tengan un efecto antiangiogénico como un mecanismo primario de acción. Ejemplos de esos agentes se describen posteriormente, cualquiera de los mismos pueden ser usados para preparar un inmunoconjugado o usado separadamente en terapia de combinación con la invención.

Numerosos inhibidores de tirosina quinasa útiles para el tratamiento de angiogénesis, como se manifiesta en varios estados de enfermedad, se conocen ahora. Estos incluyen, por ejemplo, las 4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidinas de la Patente US No 5,639,757, que también se pueden usar en combinación con la presente invención. Otros ejemplos de moléculas orgánicas capaces de modular la transducción de señal de la tirosina quinasa mediante el receptor VEGFR2 son los compuestos de quinazolina y composiciones de la Patente US No 5,792,771, que describe combinaciones adicionales para su uso con la presente invención en el tratamiento de enfermedades angiogénicas.

Los compuestos de otras clases químicas también se ha mostrado que inhiben la angiogénesis y se pueden usar en combinación con la presente invención. Por ejemplo, esteroides tales como los 4,9(11)-esteroides angiostáticos y los esteroides C21-oxigenados, como se describe en la Patente US No 5,972,922, se puede emplear en terapia combinada. Las Patentes US Nos 5,712,291 y 5,593,990, describen la talidomida y compuestos relacionados, precursores, análogos, metabolitos y productos de hidrólisis, que también se pueden usar en combinación con la presente invención para inhibir la angiogénesis. Los compuestos de las Patentes US Nos 5,712,291 y 5,593,990, se pueden administrar por vía oral. Otras sustancias antiangiogénicas ejemplares que son útiles en relación con la terapia combinada se indican en la Tabla B. Cada uno de los agentes listados en la presente memoria son ejemplares y de ninguna manera limitantes.

TABLA B

Inhibidores y Reguladores Negativos de Angiogénesis	
SUSTANCIAS	REFERENCIAS
Angiostatina	O'Reilly *et al.*, 1994
Endostatina	O'Reilley *et al.*, 1997
Fragmento de prolactina de 16kDa	Ferrara *et al.*, 1991; Clapp *et al.*, 1993; D'Angelo *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998
Péptidos de laminina	Kleinman *et al.*, 1993; Yamamura *et al.*, 1993; Iwamoto *et al.*, 1996; Tryggvason, 1993
Péptidos de fibronectina	Grant *et al.*, 1998; Sheu *et al.*, 1997
Inhibidores de metaloproteinasa tisular (TIMP 1, 2, 3, 4)	Sang, 1998
Inhibidores de activadores de plasminógeno (PAI-1, -2)	Soff et al., 1995
Factor α de necrosis tumoral (dosis alta, *in vitro*)	Frater-Schroderetal., 1987
TGF- β 1	RayChadhury y D'Amore, 1991; Tada *et al.*, 1994
Interferon (IFN-α,-β, γ)	Moore *et al.*, 1998; Ungen *et al.*, 1998
Quimiocinas ELR- CXC; IL-12; SDF-1; MIG; Factor de plaqueta 4 (PF-4); IP- 10	Moore *et al.*, 1998; Hisco y Jiang, 1997; Coughlin *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1997
Trombospondina (TSP)	Good *et al.*, 1990; Frazier, 1991; Bornstein, 1992; Tolsma *et al.*, 1993; Sheibani y Frazier, 1995; Volpert *et al.*, 1998
SPARC	Hasselaar y Sage, 1992; Lane *et al.*, 1992; Jendraschak y Sage, 1996
2-Metoxiestradiol	Fotsisetal., 1994
Proteína relacionada con proliferina	Jackson *et al.*, 1994
Suramin	Gagliardi *et al.*, 1992; Takano *et al.*, 1994; Waltenberger *et al.*, 1996; Gagliardi *et al.*, 1998, Manetti *et al.*, 1998
Talidomida	D'Amato *et al.*, 1994; Kenyon *et al.*, 1997; Wells, 1998
Cortisona	Thorpe *et al.*, 1993; Folkman *et al.*, 1983; Sakamotoetal., 1986
Linomida	Vukanovic *et al.*, 1993; Ziche *et al.*, 1998; Nagler *et al.*, 1998
Fumagilina (AGM-1470, TNP-470)	Sipos *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1998
Tamoxifeno	Gagliardi y Collins, 1993; Under y Borden, 1997; Haran *et al.*, 1994
Extracto de muérdago Coreano (*Viscum album coloratum)*	Yoon *et al.*, 1995
Retinoides	Oikawa *et al.*, 1989; Lingen *et al.*, 1996; Majewski *et al.*, 1996
CM101	Hellerqvist *et al.*, 1993; Quinn *et al.*, 1995; Wamil *et al.*, 1997; DeVoreetal., 1997
Dexametasona	Hori *et al.*, 1996; Wolff*et al.*, 1997
Factor inhibidor de leucemia (LIF)	Pepper et al., 1995

Ciertos componentes preferidos para el uso en inhibir la angiogénesis son la angiostatina, endostatina, vasculostatina, canstatina y maspina. La proteína denominada "angiostatina" se describe en las Patentes US 5,776,704, 5,639,725 y 5,733,876. La angiostatina es una proteína que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 38 kD y aproximadamente 45 kD, determinado reduciendo la electroforesis en gel de poliacrilamida, que contiene aproximadamente regiones 1 a 4 de Kringle de una molécula de plasminógeno. La angiostatina generalmente tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la de un fragmento de plasminógeno murino que comienza en el aminoácido número 98 de una molécula de plasminógeno de murino intacta.

La secuencia de aminoácidos de la angiostatina varía ligeramente entre las especies. Por ejemplo, en la angiostatina humana, la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la secuencia del fragmento de plasminógeno murino descrito anteriormente, aunque una secuencia de angiostatina humana activa puede comenzar en cualquier

aminoácido número 97 o 99 de una secuencia de aminoácidos de plasminógeno humano intacta. Además, el plasminógeno humano se puede usar, ya que tiene actividad antiangiogénica similar, como se muestra en un modelo de tumor de ratón.

Ciertas terapias antiangiogénicas han demostrado que causan regresiones en los tumores, y la angiostatina es uno de esos agentes. La endostatina, un fragmento COOH-terminal de 20 kDa del colágeno XVIII, el polisacárido bacteriano CM101, y el anticuerpo LM609 tienen también una actividad angiostática. Sin embargo, en vista a otras propiedades, a estas se hace referencia como terapias antivasculares o toxinas contra vasos de tumores, ya que no sólo inhiben la angiogénesis sino que también inician la destrucción de vasos de tumores a través de mecanismos en su mayoría no definidos.

La angiostatina y la endostatina han llegado a ser el foco de estudios intensos, ya que son los primeros inhibidores de la angiogénesis que han demostrado la capacidad de no sólo inhibir el crecimiento del tumor, sino también causar regresiones de tumor en ratones. Hay múltiples proteasas que han mostrado producir angiostatina a partir del plasminógeno que incluye elastasa, el macrófago metaloelastasa (MME), matrilisina (MMP-7), y gelatinasa B/colagenasa tipo IV (MMP-9) de 92 kDA.

La MME puede producir angiostatina a partir de plasminógeno en tumores y el factor estimulante de colonia de macrófagos de granulocitos (GMCSF) incrementa la expresión del MME mediante macrófagos que inducen la producción de angiostatina. El papel de la MME en la generación de angiostatina es soportado por el hallazgo de que la MME está de hecho expresada en muestras clínicas de carcinomas hepatocelulares de pacientes. Otra proteasa que se piensa que es capaz de producir angiostatina es la estromelisina-1 (MMP-3). La MMP-3 ha demostrado producir fragmentos parecidos a angiostatina a partir de plasminógeno *in vitro*. El mecanismo de la acción de la angiostatina actualmente no es claro, se hace la hipótesis de que se une con un receptor superficial de la célula no identificado o sobre células endoteliales que inducen que la célula endotelial sufra muerte celular programada, o detención mitótica.

La endostatina parece ser un agente antiangiogénesis y antitumoral aún más poderoso, aunque su biología es menos clara. La endostatina es eficaz causando regresiones en varios modelos de tumores en ratones. Los tumores no desarrollan resistencia a la endostatina y, después de múltiples ciclos de tratamiento, los tumores entran en un estado latente, durante el cual no aumentan el volumen. En este estado latente, el porcentaje de células de tumor que sufren apoptosis aumentó, produciendo una población que esencialmente permanece del mismo tamaño. Se cree que la endostatina se une a un receptor de la superficie de las células endoteliales, no identificado, que media su efecto.

La Patente US No 5,854,205, de Folkman y O'Reilley, se refiere a la endostatina y a su uso como inhibidor de la proliferación de células endoteliales y angiogénesis. La proteína endostatina corresponde al fragmento C Terminal del tipo colágeno XVIII y la proteína se puede aislar de una variedad de fuentes. La Patente US No 5,854,205 también explica que la endostatina puede tener una secuencia de aminoácidos o de un fragmento de colágeno tipo XVIII, un colágeno tipo XV, o BOVMPE 1 de esterasa pregástrica. Las combinaciones de endostatina con otras proteínas antiangiogénicas, particularmente angiostatina, también se describen en la Patente US No 5,854,205, de manera que las composiciones combinadas son capaces de disminuir de manera eficaz la masa de un tumor dependiente de angiogénesis.

El CM101 es un polisacárido bacteriano que se ha caracterizado bien por su capacidad para inducir inflamación neovascular en tumores. El CM101 se une con, y se reticulan receptores expresados en endotelio desdiferenciado que estimula la activación del sistema de complemento. También inicia una respuesta inflamatoria conducida por citocina que selectivamente se dirige al tumor. Es una sustancia anti-patoangiogénica exclusiva que regula negativamente la expresión del VEGF y sus receptores. El CM101 actualmente en ensayos clínicos está como un fármaco anticáncer, y se puede usar en combinación con esta invención.

La trombospondina (TSP-1) y el factor de plaqueta 4 (PF4) también se pueden usar con la presente invención. Ambos son inhibidores de angiogénesis que se asocian con heparina y se encuentran en alfagránulos de plaquetas. La TSP-1 es una glicoproteína de dominios múltiples grande de 450 kDa que es constituyente de la matriz extracelular. La TSP-1 se une con muchas de las moléculas de proteoglicanos encontrados en la matriz extracelular que incluyen, HSPGs, fibronectina, laminina, y diferentes tipos de colágeno. La TSP-1 inhibe la migración de las células endoteliales y la proliferación *in vitro* y angiogénesis en vivo. La TSP-1 también suprime el fenotipo maligno y la tumorigénesis de células endoteliales transformadas. El gen supresor de tumor p53 se ha demostrado que regula directamente la expresión de la TSP-1, de manera que, la pérdida de la actividad de p53 causa una reducción drástica en la producción de la TSP-1 y un aumento concomitante en la angiogénesis iniciada en el tumor.

La PF4 es una proteína de 70 aa que es miembro de la familia de quimiocinas CXC ELR que es capaz de inhibir fuertemente la proliferación de células endoteliales *in vitro*, y la angiogénesis en vivo. La PF4 administrada intratumpor vía oral o administrada mediante un vector adenoviral es capaz de causar una inhibición del crecimiento del tumor.

Los interferones y los inhibidores de metaloproteinasas son dos clases de inhibidores angiogénicos que se presentan naturalmente que se pueden administrar con la presente invención. La actividad antiendotelial de los interferones se ha

conocido ya desde principios de la década de los 80, sin embargo, el mecanismo de inhibición todavía no es claro. Se sabe que puede inhibir la migración de las células endoteliales y que tiene alguna actividad antiangiogénica en vivo que posiblemente es mediada por una capacidad para inhibir la producción de promotores angiogénicos por células de tumor. Los tumores vasculares en particular son sensibles al interferón, por ejemplo, los hemangiomas proliferativos se pueden tratar satisfactoriamente con IFNα.

Los inhibidores de metaloproteinasas tisulares (TIMP) son una familia de inhibidores de origen natural de metaloproteasas de matriz (MMP) que también pueden inhibir la angiogénesis y se pueden usar en protocolos de tratamiento de la presente invención. Las MMP representan un papel clave en el proceso angiogénico, ya que degradan la matriz a través de la cual las células endoteliales y los fibroblastos migran cuando se extienden o remodelan la red vascular. De hecho, se ha demostrado que un miembro de las MMP, la MMP-2, se asocia con el endotelio activado a través de la integrina αvβ3, presumiblemente con este fin. Si esta interacción se interrumpe por un fragmento de MMP-2, entonces la angiogénesis se disminuye y se inhibe el crecimiento de los tumores.

Hay varios agentes farmacológicos que inhiben la angiogénesis, uno o más de los cuales se pueden usar como parte de la presente invención. Estas incluyen AGM-1470/TNP-470, talidomida, y carboxiamidotriazol (CAI). La fumagilina se ha encontrado que es un potente inhibidor de la angiogénesis en 1990, y desde entonces se han desarrollado los análogos sintéticos de la fumagilina, AGM-1470 y TNP-470. Estos fármacos inhiben la proliferación de células endoteliales *in vitro* y la angiogénesis en vivo. La TNP-470 se ha estudiado ampliamente en ensayos clínicos humanos con datos que sugieren que la administración a largo plazo es óptima.

La talidomida se usó originalmente como un sedante, pero se descubrió que era un fuerte teratógeno y se suprimió. En 1994 se descubrió que la talidomida era un inhibidor de la angiogénesis. La talidomida actualmente está en estudios clínicos como un agente anticanceroso, así como un tratamiento de enfermedades oculares vasculares.

El CAI es un inhibidor sintético de bajo peso molecular de la angiogénesis que actúa como un bloqueador del canal de calcio que impide la reorganización de la actina, la migración de las células endoteliales y la dispersión sobre colágeno IV. El CAI inhibe la neovascularización en concentraciones alcanzables fisiológicas y es muy tolerado por vía oral por los pacientes de cáncer. Los ensayos clínicos con CAI han producido estabilización de enfermedad en el 49 por ciento de los pacientes de cáncer que tienen enfermedad progresiva antes del tratamiento.

La cortisona en presencia de heparina o de fragmentos de heparina ha demostrado inhibir el crecimiento de tumores en ratones bloqueando la proliferación de células endoteliales. El mecanismo involucrado en el efecto inhibidor aditivo del esteroide y la heparina no es claro, aunque se piensa que la heparina puede incrementar la asimilación del esteroide por las células endoteliales. La mezcla ha demostrado aumentar la disolución de la membrana de base que está por debajo de los capilares recientemente formados, y esto también es una posible explicación del efecto angiostático aditivo. Los conjugados de heparina-cortisol también tienen efectos potentes angiostático y antitumoral de actividad *in vivo*.

Otros inhibidores de angiogénesis específicos, pueden ser administrados a tumores usando los métodos de localización dirigida de tumores, de la presente invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, Factor Anti-invasivo, ácidos retinoicos y paclitaxel (Patente US No 5,716,981; AGM-1470 (Ingber y colaboradores, 1990); extracto de cartílago de tiburón (Patente US No 5, 618,925); poliamida aniónica u oligómeros de poliurea (Patente US No 5,593,664); derivados de oxindol (Patente US No 5,576,330) derivados de estradiol (Patente US No 5,504,074); y derivados de tiazolpirimidina (Patente US No 5,599,813) también se contemplan para su uso como composiciones antiangiogénicas para los usos combinados de la presente invención.

Las composiciones que comprenden un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ integrina también se pueden usar para inhibir la angiogénesis en combinación con la presente invención. Como se describe en la Patente US No 5,766,591, los polipéptidos que contienen RGD y sales de los mismos, que incluyen polipéptidos cíclicos, son ejemplos convenientes de antagonistas de integrina $\alpha_v\beta_3$.

Como angiopoyetinas se encuentran los ligandos para la Tie2, se pueden usar otros métodos de intervención terapéutica basados en la alteración de la señalización a través del receptor Tie2, en combinación con los mismos. Por ejemplo, se puede emplear un receptor Tie2 soluble, capaz de bloquear la activación del Tie2 (Lin *et al.*, 1998a). El suministro de dicha construcción que usa terapia genética adenoviral recombinante ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del cáncer y en reducir la metástasis (Lin *et al.*, 1998a).

Las angiopoyetinas, en común con los miembros de la familia de VEGF, son factores de crecimiento muy específicos para el endotelio vascular (Davis y Yancopoulos, 1999; Holash y colaboradores, 1999). Las angiopoyetinas primero descritas fueron un agonista o activador receptor que se presenta naturalmente, angiopoyetina-1 (Ang-1), y un antagonista receptor que se presenta naturalmente, angiopoyetina-2 (Ang-2), ambas de estas actúan mediante un receptor de la tirosina quinasa de célula endotelial, Tie2.

Dos nuevas angiopoyetinas, angiopoyetina-3 (ratón) y angiopoyetina-4 (humana) también se han identificado (Valenzuela y colaboradores, 1999). La angiopoyetina-3 parece actuar como un antagonista (parecida a la Ang-2),

mientras que la angiopoyetina-4 parece funcionar como un agonista (como la Ang-1) (Valenzuela y colaboradores, 1999). Una proteína denominada angiopoyetina-3 también fue clonada a partir de corazón humano y se reportó que no tenía efectos mitogénicos sobre células endoteliales (Kim, *et al.*, 1999).

Mientras que la VEGF es necesaria para las etapas iniciales del desarrollo vascular, la angiopoyetina-1 generalmente se requiere para las etapas posteriores a la vascularización. El VEGF de este modo actúa para promover la diferenciación, proliferación de células endoteliales y la formación de vasos primitivos. La angiopoyetina-I actúa, vía el receptor Tie2, para promover el mantenimiento y la estabilización de vasos maduros. La angiopoyetina-1 de este modo es un factor de maduración o estabilización, que se piensa que convierte los vasos inmaduros en vasos maduros promoviendo interacciones entre las células endoteliales y las células de soporte circundantes (Holash, *et al.*, 1999).

F6. Agentes que Inducen la Apoptosis

La presente invención también se puede usar para administrar sustancias que inducen apoptosis en cualquier célula dentro del tumor, incluyendo células de tumor y células endoteliales vasculares de tumor. Aunque muchos agentes anticancerosos pueden tener, como parte de su mecanismo de acción, un efecto que induce la apoptosis. Cualquiera de uno o más de esos agentes descritos para el uso en terapia de combinación, incluyendo los de la Tabla F, pueden ser conjugados también a un anticuerpo de la invención, tal como se describe en la presente memoria. Ciertos otros agentes han sido descubiertos, diseñados o seleccionados para que tengan un efecto inductor de apoptosis como un mecanismo primario. Ejemplos de esos agentes se describen a continuación, cualquiera de los mismos pueden ser usados para preparar un inmunoconjugado o usados separadamente en terapia de combinación con la invención.

Muchas formas de cáncer tienen reportes de mutación en los genes supresores de tumores, tales como p53. La inactivación de p53 da como resultado una falla para promover la apoptosis. Con esta falla, las células del cáncer progresan en la tumorigénesis, en vez de estar destinadas para la muerte celular. De este modo, la provisión de los supresores del tumor también se contempla para su uso en la presente invención para estimular la muerte celular. Los supresores de tumor ejemplares incluyen, pero no se limitan a, p53, el gen del Retinoblastoma (Rb), tumor de Wilm (WT1), bax alfa, enzima que convierte interleucina 1b y familia, el gen MEN-1, neurofibromatosis, tipo 1 (NF1), inhibidor cdk p16, gen de cáncer colorrectal (DCC), gen de poliposis adenomatosis familiar (FAP), en supresor de tumor múltiple (MTS-1), BRCA1 y BRCA2.

Se prefieren para su uso el p53 (Patente US No 5,747,469; 5,6,771,78 y 5,756,455), Retinoblastoma, BRCA1 (Patentes US 5,750,400; 5,654,155; 5,710,001; 5,756,294; 5,709,999; 5,693,473; 5,753,441; 5,622,829 y 5,747,282; cada una incorporada en la presente memoria como referencia), MEN-1 (número de acceso GenBank U93236) y adenovirus E1A (Patente US No 5,776,743).

Otros oncogenes que inhiben la apoptosis o muerte celular programada, incluyen, aunque no están limitados a, bcr-abl, bcl-2 (distinto del bcl-1, ciclina D1; números de acceso a GenBank M14745, X06487; patentes US Nos 5,650,491; y 5,539,094 y miembros de la familia incluyendo el Bcl-xl, Mcl-1, Bak, A1, A20. La sobreexpresión del bcl-2 fue descubierta por primera vez en linfomas de las células T. Las funciones bcl- 2 como un oncogén uniendo e inactivando el Bax, una proteína en la ruta apoptótica. La inhibición de la función bcl-2 impide la inactivación del Bax, y permite que proceda la ruta apoptótica. De esa manera, la inhibición de esta clase de oncogenes, por ejemplo usando secuencias de nucleótidos antisentido, se contempla para el uso en la invención en aspectos en donde se desea el aumento de la apoptosis (patentes US Nos 5,650,491; 5,539,094; y 5,583,034).

Otras composiciones que se pueden administrar mediante los anticuerpos de la presente invención, incluyen genes que codifican el factor de necrosis de tumor relacionado con apoptosis que induce ligandos denominados TRAIL, y el polipéptido TRAIL (Patente US No 5,763,223); la proteasa asociada con apoptosis de 24 kD de la Patente US No 5,605,826; el factor asociado Fas 1, FAF1 (Patente US No 5,750,653). También se contempla para su uso en estos aspectos de la presente invención la provisión de la enzima convertidora de interleucina-1β y miembros de la familia, de los que también se describe que estimulan la apoptosis.

Los compuestos tales como derivados de carbostirilo (Patentes US Nos 5,672,603; y 5,464,833); los péptidos apogénicos ramificados (Patente US No 5,591,717); inhibidores de fosfotirosina y análogos de fosfotirosina no hidrolizables (Patentes US Nos 5,565,491; y 5,693,627); agonistas de receptores retinoideos RXR (Patente US No 5,399,586); e incluso también pueden usarse antioxidantes (Patente US No 5,571,523). Los inhibidores de la tirosina quinasa, tales como genisteína, también se pueden unir a los anticuerpos de la presente invención (como lo confirma la Patente US No 5,587,459).

F7. Agentes Antivirales

Como los fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, particularmente la FS y la FE, llegan a quedar expuestos en las células infectadas viralmente, los anticuerpos de la invención, tales como los anticuerpos 9D2 y 3G4 (ATCC 4545), también pueden ser enlazados a cualquiera de uno o más agentes antivirales. Razones adicionales que soportan estos aspectos de la invención, y las ventajas de las mismas, se describen con mayor detalle posteriormente con respecto al péptido de unión a la FE, los conjugados antivirales.

Los agentes antivirales ejemplares que son para la unión a anticuerpos o péptidos se describen también con mayor detalle con relación al péptido de unión a la PE, conjugados antivirales de la invención. Algunos o más agentes antivirales, incluyendo los de la Tabla G, pueden ser conjugados a un anticuerpo de la invención, tal como se describe en la presente memoria. Esos agentes antivirales pueden ser usados también separadamente en las terapias antivirales de combinación de la invención.

G. Equivalentes Biológicamente Funcionales

Los equivalentes, o aún mejoramientos, de los anticuerpos y efectores, también se pueden hacer ahora, generalmente usando los materiales proporcionados anteriormente como punto de partida. Las modificaciones y cambios se pueden hacer en la estructura de un anticuerpo así y todavía obtener una molécula que tiene características parecidas o deseables de otro modo. Por ejemplo, ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva. Estas consideraciones también se aplican a toxinas, sustancias antiangiogénicas, sustancias que inducen la apoptosis, coagulantes y similares.

Ya que son la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína las que definen la actividad funcional biológica de la proteína, ciertas sustituciones de secuencias de aminoácidos pueden hacerse en una secuencia de proteína (o desde luego, la secuencia de ADN subyacente) y sin embargo obtener una proteína con propiedades similares (agonista). De este modo se contempla que se pueden hacer varios cambios en la secuencia de los anticuerpos o las sustancias terapéuticas (o las secuencias de ADN subyacentes) sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica. Los equivalentes biológicamente funcionales hechos de la secuencia de ADN subyacente mutada se pueden hacer usando la información de codones proporcionada en la presente memoria en la Tabla A, y los detalles técnicos de soporte en la mutagénesis específica del sitio.

También se entiende bien por los expertos en la técnica que, inherente en la definición de una proteína o péptido "equivalente biológicamente funcional", está el concepto de que hay un límite al número de cambios que se pueden hacer dentro de una porción definida de la molécula y todavía dar como resultado una molécula con un nivel aceptable de actividad biológica equivalente. Las proteínas y péptidos biológicamente funcionalmente equivalentes de este modo se definen en la presente memoria como aquellas proteínas y péptidos en los cuales ciertos, no la mayoría ni todos, de los aminoácidos se pueden sustituir. Desde luego, una pluralidad de proteínas/péptidos distintos con diferentes sustituciones fácilmente se pueden hacer y usar de acuerdo con la invención.

Las sustituciones de aminoácidos generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga, tamaño, y similares. Un análisis del tamaño, la forma y el tipo de los sustituyentes de cadenas laterales de aminoácidos revela que la arginina, lisina e histidina todas son restos cargados positivamente; que la alanina, glicina y serina todas tienen un tamaño similar; y que la fenilalanina, el triptófano y la tirosina todas tienen una forma generalmente similar. Por lo tanto, basándose en estas consideraciones, arginina, lisina e histidina; alanina, glicina y serina; y fenilalanina, triptófano y tirosina; se definen en la presente memoria como equivalentes biológicamente funcionales.

Para hacer más cambios cuantitativos, el índice hidropático de los aminoácidos se puede considerar. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en función de sus características de hidrofobicidad y carga: isoleucina (+4.5); valina (+4.2); leucina (+3.8); fenilalanina (+2.8); cisteína/cistina (+2.5); metionina (+1.9); alanina (+1.8); glicina (-0.4); treonina (-0.7); serina (-0.8); triptófano (-0.9); tirosina (-1.3); prolina (-1.6); histidina (-3.2); glutamato (-3.5); glutamina (-3.5); aspartato (-3.5); asparagina (-3.5); lisina (-3.9); y arginina (-4.5).

La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir función biológica interactiva en una proteína generalmente se entiende en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982, incorporada en la presente memoria como referencia). Se sabe que ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático o calificación similar y todavía retienen una actividad biológica similar. Al hacer cambios basándose en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de los aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ±2, siendo los que están dentro de ± 1 particularmente preferidos, y siendo los que están dentro de ±0,5 aún más particularmente preferidos.

Así se entiende que un aminoácido se puede sustituir por otro que tenga un valor de hidrofilicidad similar y todavía obtener una proteína equivalente biológicamente. Como se detalla en la Patente US No 4,554,101, los siguientes valores de hidrofilicidad han sido asignados a los restos de aminoácidos: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+3.0 ± 1); glutamato (3.0 ± 1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (-0.4); prolina (-0.5 ± 1); alanina (-0.5); histidina (-0.5); cisteína (-1.0); metionina (-1.3) valina (-1.5); leucina (-1.8); isoleucina (-1.8); tirosina (-2.3); fenilalanina (-2.5); triptófano (-3.4).

Al hacer cambios basados en los valores de hidrofilicidad, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilicidad están dentro de ±2, siendo los que están dentro de ± 1 particularmente preferidos, y siendo los que están dentro de ±0,5 aún más particularmente preferidos.

H. Conjugación

Los anticuerpos contra los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, incluyendo los anticuerpos anti-FS seleccionados, con propiedades mejoradas, tales como el 9D2 y 3G4 (ATCC 4545), pueden ser conjugados o unidos a, o funcionalmente asociados con, agentes anticelulares y citotóxicos para preparar "inmunotoxinas"; a coagulantes, ya sea directa o indirectamente, para preparar "coaguligandos"; o a agentes antivirales, tales como nucleósidos, para preparar inmunoconjugados antivirales o "inmunovirocidas". Los péptidos de unión a la FE tales como la duramicina pueden ser conjugados o unidos también a, o asociados funcionalmente con, transportadores inertes, agentes para localización dirigida o agentes antivirales, para preparar un intervalo de derivados de péptidos de unión a la FE y conjugados de péptidos antivirales.

Aunque se prefieren los enlaces covalentes, se pueden usar también otros medios de unión funcional. Por ejemplo, las construcciones unidas pueden generarse usando puentes de avidina: biotina. Además del conocimiento disponible a aquellos de experiencia ordinaria en la técnica, la patente US de propiedad común No 6,093, 399 describe y habilitar adicionalmente el uso de la avidina: biotina en la unión funcional de anticuerpos y agentes de localización dirigida, a agentes biológicos y terapéuticos.
Los dos agentes pueden unirse también mediante una segunda región de unión, preferentemente una región de unión al anticuerpo o al antígeno del mismo. Esto se ilustra mediantes los coaguligandos, donde el agente diana se une al coagulante a través de una segunda región de unión (patentes US Nos 6,093, 399, 6,004,555, 5,877,289 y 6,036,955), que han sido producidas y usadas satisfactoriamente en el tratamiento del cáncer. En donde el primer agente de localización dirigida es un anticuerpo o una región al antígeno, el uso de una segunda región de unión que es también un anticuerpo, o una región de unión al antígeno, da por resultado una construcción biespecífico del anticuerpo. La preparación y el uso de anticuerpos biespecíficos son, en general, bien conocidos en la técnica, y se describen adicionalmente en la presente memoria.

La tecnología de inmunoconjugados es conocida generalmente ahora en la técnica. Sin embargo, se pueden lograr ciertas ventajas mediante la aplicación de cierta tecnología preferida, tanto en la preparación como en la purificación para la administración clínica posterior. Por ejemplo, aunque las construcciones a base de IgG exhibirán típicamente mejor capacidad de unión y una eliminación más lenta en la sangre, que sus contrapartes Fab', las construcciones basados en fragmentos Fab' exhibirán generalmente mejor capacidad de penetración a los tejidos.

Adicionalmente, aunque se conocen numerosos tipos de enlazadores que contienen enlaces disulfuro, que pueden emplearse satisfactoriamente en la conjugación de anticuerpos y péptidos, ciertos enlazadores serán generalmente preferidos con respecto a otros, en base a diferentes características y capacidades farmacológicas. Por ejemplo, se prefieren los enlazadores que contienen un enlace disulfuro que se encuentre estéricamente "impedido", debido a su mayor estabilidad *in vivo*, impidiendo así la liberación del coagulante antes de la unión en el sitio de acción.

Cada tipo de reticulador, así de cómo se lleva a cabo la reticulación, tenderá a variar la farmacodinámica del conjugado resultante. Se puede desear tener un conjugado que permanezca intacto en las condiciones encontradas en cualquier parte del cuerpo excepto el sitio de acción deseado, punto en el cual es deseable que el conjugado tenga buenas características de "liberación". Por lo tanto, el esquema particular de reticulación, incluyendo en particular el reactivo de reticulación particular, usado, y las estructuras que son reticuladas, serán de cierto significado.

Dependiendo de los agentes específicos que vayan a ser conjugados, puede ser necesario o deseable proporcionar un espaciador péptido unido funcionalmente al anticuerpo o al péptido de unión a la FE y al segundo o agente terapéutico. Ciertos espaciadores péptidos pueden plegarse en una estructura de espira unida con disulfuro. La escisión proteolítica dentro de la espira producirá entonces un polipéptido heterodimérico en donde el anticuerpo y el agente terapéutico se encuentran enlazados únicamente por un solo enlace disulfuro. Un ejemplo de esa toxina es la toxina de cadena Ricina A.

Cuando se usen ciertos compuestos diferentes a toxinas, se puede proporcionar un espaciador peptídico no escindible, para unirse funcionalmente al anticuerpo y al compuesto de toxina de la proteína de fusión. Las toxinas que pueden ser usadas junto con espaciadores peptídicos no escindibles, son aquellas que pueden por sí mismas ser convertidas por la ruptura proteolítica, en una forma unida al disulfuro, citotóxica. Un ejemplo de ese compuesto es el de la exotoxina de *Pseudomonas*.

Una variedad de agentes quimioterapéuticos y otros agentes farmacológicos han sido ahora conjugados satisfactoriamente con anticuerpos y demuestran funcionar farmacológicamente. Agentes antineoplásicos ejemplares que han sido investigados incluyen la doxorrubicina, daunomicina, metotrexato, vinblastina y varios otros. Además, la unión de otros agentes, tales como, neocarcinostatina, macromicina, trenimon y α-amanitina, también ha sido descrita. Estos métodos de unión pueden adaptarse para su uso con la presente invención.

Cualquier enlace covalente con el anticuerpo o péptido de unión a la FE, será hecho idealmente en un sitio distinto del (de los) sitio(s) funcional(es). Las composiciones son entonces "unidas" en una manera operativa que permite que cada región desempeñe su función pretendida, sin daño significativo, en particular, de manera tal que el construcción

resultante se enlace aún al antígeno pretendido o a la FE y de tal manera que el agente unido mantenga sustancialmente la actividad biológica y/o recupere la actividad biológica cuando sea liberado de la construcción.

H1. Reticulantes bioquímicos

Además de la información general proporcionada anteriormente, los anticuerpos o péptidos de unión a la FE se pueden conjugar con agentes terapéuticos o con otros agentes, usando ciertos reticulantes bioquímicos preferidos. Los reactivos de reticulación se usan para formar puentes moleculares que unen entre sí grupos funcionales de dos moléculas diferentes. Para unir dos proteínas diferentes de una manera gradual, se pueden usar reticulantes heterobifuncionales que eliminan la formación de homopolímeros no deseada. Los reticulantes heterobifuncionales ejemplares se presentan en la Tabla C.

TABLA C

RETICULANTES HETERO-BIFUNCIONALES			
Reticulante	Reactivo hacia	Ventajas y Aplicaciones	Longitud del brazo Espaciador después de la Reticulación
SMPT	Aminas primarias sulfhidrilos	Mayor estabilidad	11,2 A
SPDP	Aminas primarias sulfhidrilos	TWolación Reticulación escindible	6,8 A
LC-SPDP	Aminas primarias sulfhidrilos	Brazo espaciador extendido	15,6 A
Sulfo-LC-SPDP	Aminas primarias sulfhidrilos	Brazo espaciador extendido Soluble en agua	15,6 A
SMCC	Aminas primarias sulfhidrilos	Grupo reactivo maleimida estable Conjugación enzima-anticuerpo Conjugación proteína transportadora –Hapteno	11,6 A
Sulfo-SMCC	Aminas primarias sulfhidrilos	Grupo reactivo maleimida estable Soluble en agua Conjugación enzima-anticuerpo	11,6 A
MBS	Aminas primarias sulfhidrilos	Conjugación enzima-anticuerpo Conjugación proteína transportadora-Hapteno	9,9 A
Sulfo-MBS	Aminas primarias sulfhidrilos	Soluble en agua	9,9 A
SIAB	Aminas primarias sulfhidrilos	Conjugación enzima-anticuerpo	10,6 A
Sulfo-SIAB	Aminas primarias sulfhidrilos	Soluble en agua	10,6 A
SMPB	Aminas primarias sulfhidrilos	Brazo espaciador extendido Conjugación enzima-anticuerpo	14,5 A
Sulfo-SMPB	Aminas primarias sulfhidrilos	Brazo Espaciador extendido Soluble en agua	14,5 A
EDC/Sulfo-NHS	Aminas primarias grupos carboxilo	Conjugación Hapteno-Transportador	0
ABH	Carbohidratos no selectivos	Reacciona con grupos azúcar	11,9 A

Los reticulantes hetero-bifuncionales contienen dos grupos reactivos: uno generalmente reacciona con un grupo amino primario (por ejemplo, N-hidroxisuccinimida) y el otro generalmente reacciona con un grupo tiol (por ejemplo, disulfuro de piridilo, maleimidas, halógenos, etc.). A través del grupo reactivo amina primario, el reticulador puede reaccionar con el/los restos de lisina de una proteína (por ejemplo, el anticuerpo, fragmento o péptido de unión a la FE, seleccionado) y a través del grupo reactivo tiol, el reticulador, ya unido a la primera proteína, reacciona con el resto de cisteína (grupo sulfhidrilo libre) de la otra proteína.

Las composiciones por lo tanto generalmente tienen, o se derivan para tener, un grupo funcional disponible para propósitos de reticulación. Este requisito no se considera que sea limitante porque una amplia variedad de grupos se puede usar de esta manera. Por ejemplo, grupos amina primarios o secundarios, grupos hidrazida o hidrazina, alcohol carboxílico, carbamato, fosfato, o grupos alquilantes se pueden usar para unir o reticular.

El brazo espaciador entre dos grupos reactivos de reticulantes puede tener varias longitudes y composiciones químicas. Un brazo espaciador más largo permite una flexibilidad mejor de los componentes del conjugado aunque algunos componentes particulares en el puente (por ejemplo grupo benceno) pueden prestar estabilidad extraordinaria al grupo reactivo o una resistencia aumentada del enlace químico a la acción en varios aspectos (por ejemplo enlace disulfuro resistente a la sustancia reductora). El uso de espaciadores peptídicos, tales como L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala, también se contempla.

Se prefiere emplear un reticulante que tenga una estabilidad razonable en la sangre. Numerosos tipos de enlaces disulfuro que contienen enlazadores se conocen que pueden emplearse satisfactoriamente en la conjugación. Los enlazadores que contienen un enlace disulfuro que esté estéricamente impedido pueden demostrar tener mayor estabilidad *in vivo*, evitando la liberación de la sustancia antes del enlace en el sitio de acción. Estos enlazadores de este modo son un grupo preferido de agentes de enlace.

Uno de los reactivos de reticulación más preferidos es el SMPT, el cual es un reticulador bifuncional que contiene un enlace disulfuro que está "estéricamente impedido" por un anillo de benceno adyacente y grupos metilo. Se cree que el impedimento estérico del enlace disulfuro sirve como una función de protección del enlace del ataque de aniones tiolados tales como glutationa que puede estar presente en tejidos y sangre, y mediante esto ayuda a evitar el desacoplamiento del conjugado antes de la administración de la sustancia unida al sitio del tumor. Se contempla que la sustancia SMPT también se puede usar en relación con los conjugados de esta invención.

El reactivo de reticulación SMPT, como con muchos otros reactivos de reticulación conocidos, presta la habilidad de reticular grupos funcionales tales como el SH de la cisteína o de las aminas primarias (por ejemplo el grupo amino epsilón de lisina). Otro tipo posible de reticulador incluye las fenilazidas fotorreactivas hetero-bifuncionales que contienen un enlace disulfuro escindible tal como el etil-1,3'-ditiopropionato de sulfosuccinimidil-2-(p-azido Salicilamido). El grupo N-hidroxisuccinimidilo reacciona con grupos amino primarios y el fenilazida (después de la fotolisis) reacciona en forma no selectiva con cualquier resto de aminoácido.

Además de los reticulantes impedidos, también se pueden emplear enlazadores no impedidos de acuerdo con la presente memoria. Otros reticulantes útiles, no consideran contener o generar un disulfuro protegido, incluyen SATA, SPDP y 2-iminotiolano. El uso de estos reticulantes está bien entendido en la técnica.

En cuanto se conjugan, el conjugado se separa de los anticuerpos o péptidos y otros agentes, y de otros contaminantes. Un gran número de técnicas de purificación están disponibles para su uso para proporcionar conjugados con un grado suficiente de pureza para hacerlos clínicamente útiles. Los métodos de purificación basados en la separación por tamaños, tales como la filtración en gel, la permeación en gel o la cromatografía líquida de alto rendimiento, generalmente será de mayor uso. Otras técnicas cromatográficas tales como la separación de Sefarosa Azul, también se pueden usar.

H2. Enlazadores biológicamente liberables

Aunque se prefiere que cualquier fracción de enlace tenga estabilidad razonable en la sangre, para evitar la liberación sustancial de un agente terapéutico unido antes de dirigirse a la enfermedad, por ejemplo, el sitio del tumor, en ciertos aspectos, se contempla el uso de enlaces biológicamente liberables y/o espaciadores selectivamente escindibles o enlazadores. Los "enlaces biológicamente liberables" y "los espaciadores o enlazadores selectivamente escindidos" todavía tienen una estabilidad razonable en la circulación.

Los anticuerpos o péptidos de unión a la FE de conformidad con la invención, de este modo se pueden unir a uno o más segundos agentes terapéuticos vía un enlace biológicamente liberable. Cualquier forma de anticuerpo o agente de localización dirigida se puede emplear, incluyendo los anticuerpos intactos, aunque los fragmentos ScFv serán preferidos en ciertas realizaciones.

Los "enlaces biológicamente liberables" o "enlaces selectivamente hidrolizables" incluyen todos los enlaces que son liberables, escindibles o hidrolizables solamente o preferencialmente en ciertas condiciones. Esto incluye enlaces disulfuro y trisulfuro y enlaces de ácido lábiles, como se describe en las Patentes US Nos 5,474,765 y 5,762,918.

El uso de un espaciador sensible a ácidos para la unión de un agente terapéutico con un anticuerpo o péptido de unión a la FE de la invención, se contempla particularmente. En estas realizaciones, los agentes terapéuticos se liberan dentro de los compartimentos ácidos adentro de una célula. Se contempla que la liberación sensible al ácido pueda ocurrir extracelularmente, pero todavía después de la dirección específica, preferiblemente al sitio del tumor o célula infectada viralmente. Ciertos ejemplos actualmente preferidos incluyen anticuerpos parecidos a 2C3 enlazados con colchicina o doxorrubicina vía un espaciador sensible al ácido. La unión mediante las fracciones de carbohidrato de los anticuerpos también se contempla. En estas realizaciones, las sustancias terapéuticas o fármacos se liberan dentro de los compartimentos ácidos dentro de una célula.

El anticuerpo o péptido de unión a la también se puede derivar para introducir grupos funcionales que permitan la unión de los agentes terapéuticos a través de un enlace biológicamente liberable. El anticuerpo o péptido de unión a la FE de este modo se puede derivar para introducir cadenas laterales que terminen en hidrazida, hidrazina, amina primaria o grupos amina secundarios. Las sustancias terapéuticas se pueden conjugar a través del enlace de base de Schiff, un enlace hidrazona o acil hidrazona o un enlazador hidrazida (Patentes US Nos 5,474,765 y 5,762,918).

En las Patentes US Nos 5,474,765 y 5, 762,918 también se describe que el anticuerpo o péptido de unión a la FE se puede unir operativamente a las sustancias terapéuticas a través de uno o más enlaces biológicamente liberables que son enlaces sensibles a enzimas, incluyendo enlaces de péptidos, ésteres, amidas, fosfodiésteres y glucósidos.

Ciertos aspectos preferidos de la invención se refieren al uso de enlazadores peptídicos que incluyen cuando menos un primer sitio de escisión para una peptidasa y/o proteinasa que se localiza preferencialmente dentro del sitio de la enfermedad, particularmente dentro del ambiente del tumor. La administración mediada por anticuerpo de la sustancia terapéutica unida da como resultado la escisión específicamente dentro del sitio de enfermedad o ambiente del tumor, dando como resultado la liberación específica de la sustancia activa. Ciertos enlazadores peptídicos incluirán un sitio de escisión que es reconocido por una o más enzimas involucradas en la remodelación.

Los enlazadores peptídicos que incluyen un sitio de escisión para la uroquinasa, pro-uroquinasa, plasmina, plasminógeno, TGFβ, estafiloquinasa, trombina, Factor IXa, Factor Xa o una metaloproteinasa, tal como colagenasa intersticial, una gelatinasa o una estromelisina, se prefieren particularmente. Las Patentes US Nos 6,004,555, 5,877,289, y 6, 093,399 describen adicionalmente y habilitan cómo hacer y usar inmunoconjugados que comprenden enlaces biológicamente liberables y enlazadores y péptidos selectivamente escindibles. La Patente US No 5,877,289, describe adicionalmente y habilita de qué manera usar los inmunoconjugados que comprenden un enlazador peptídico selectivamente escindible que es escindido por uroquinasa, plasmina, trombina, Factor IXa, Factor Xa o una metaloproteinasa, tal como una colagenasa intersticial, una gelatinasa o una estromelisina, dentro de un ambiente de tumor.

Los enlazadores peptídicos selectivamente escindibles actualmente preferidos son aquellos que incluyen un sitio de escisión para plasmina o una metaloproteinasa (también conocida como "metaloproteasas de matriz" o "MMP"), tal como una colagenasa intersticial, una gelatinasa o una estromelisina. Los enlazadores peptídicos adicionales que se pueden usar de manera ventajosa en relación con la invención incluyen, por ejemplo secuencias que escinden la plasmina, tales como aquellas que pueden ser escindidas por la pro-uroquinasa, TGFβ, plasminógeno y estafiloquinasa; secuencias que escinden el factor Xa; secuencias que escinden el MMP tales como aquellas que pueden ser escindidas por la gelatinasa A; secuencias se escinden la colagenasa, tales como aquellas que pueden ser escindidas por el colágeno de piel de becerro (cadena α1(I)), colágeno de piel de becerro (cadena α2(I)), colágeno de cartílago de bovino (cadena α1(II)), colágeno de hígado humano (cadena α1(III)), α_2M humano, PZP humano, α_1M de rata, α_2M de rata, α_1I_3(2J) de rata, α_1I_3(27J) de rata, y los sitios de escisión autolítica de la colagenasa de fibroblastos humanos. Además del conocimiento disponible por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica, el texto y secuencias de la tabla B2 en las patentes US de propiedad conjunta Nos 6,342,219, 6,524,583, 6,342,221 y 6,416,758, que describen y habilitan de forma adicional el uso de dichas secuencias escindibles.

H3. Anticuerpos Biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos en general se pueden emplear, en tanto un brazo se enlace con un fosfolípido aniónico o aminofosfolípido, y el anticuerpo biespecífico se una, en un sitio distinto de los sitios de unión de antígenos, a un agente terapéutico.

En general, la preparación de anticuerpos biespecíficos también es muy conocida en la técnica. Un método implica la preparación por separado de anticuerpos que tengan especificidad por el fosfolípido aniónico o aminofosfolípido, por un lado, y por el otro, un agente terapéutico. Los fragmentos pépticos $F(ab'\gamma)_2$ se preparan a partir de dos anticuerpos elegidos, seguido de la reducción de cada uno para proporcionar fragmentos $Fab'\gamma_{SH}$ distintos. Los grupos SH en uno de los dos compañeros que se van a acoplar se alquilan después con un reactivo de reticulación tal como *O*-fenilendimaleimida para proporcionar grupos maleimida libres sobre el otro compañero. Este compañero se puede conjugar entonces con el otro por medio de un enlace tioéter, para dar el heteroconjugado deseado $F(ab'\gamma)_2$. Se conocen otras técnicas se conocen donde se realiza la reticulación con SPDP o con la proteína A, o se prepara una construcción triespecífica.

Otro método para producir anticuerpos biespecíficos es mediante la fusión de dos hibridomas para formar un cuadroma. Como se usa en la presente memoria, el término "cuadroma" se usa para describir la fusión productiva de dos hibridomas de células B. Usando ahora técnicas estándares, dos hibridomas que producen anticuerpos se fusionan para dar células hijas, y estas células que han mantenido la expresión de ambos conjuntos de genes de inmunoglobulina de clonotipo se seleccionan.

Un método preferido para generar un cuadroma involucra la selección de un mutante deficiente de enzima de cuando menos uno de los hibridomas parentales. Esta primera línea celular de hibridoma mutante se fusiona con células de un segundo hibridoma que ha sido expuesto letalmente, por ejemplo, a yodoacetamida, impidiendo su supervivencia

continuada. La fusión celular permite el rescate del primer hibridoma adquiriendo el gen de su deficiencia de enzima del hibridoma tratado letalmente, y el rescate del segundo hibridoma a través de la fusión con el primer hibridoma. Se prefiere, pero no se requiere, la fusión de inmunoglobulinas del mismo isotipo, pero de una subclase diferente. Un anticuerpo de subclases mezclados permite el uso de un ensayo alternativo del aislamiento de un cuadroma preferido.

En mayor detalle, un método de desarrollo de cuadroma y de selección implica obtener una línea de hibridoma que secreta el primer anticuerpo monoclonal elegido y hacer éste deficiente de la enzima metabólica esencial, hipoxantinaguanina fosforribosiltransferasa (HGPRT). Para obtener mutantes deficientes del hibridoma, se cultivan células en presencia de concentraciones crecientes de 8-azaguanina (1×10^{-7} M hasta 1×10^{-5} M). Los mutantes se subclonan limitando la dilución y probando su sensibilidad a la hipoxantina/aminopterina/timidina (HAT). El medio de cultivo puede consistir, por ejemplo, en MEMD complementado con SBF al 10%, L-Glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina 1 mM.
Una línea celular de hibridoma complementaria que produce el segundo anticuerpo monoclonal deseado se usa para generar los cuadromas mediante técnicas de fusión celular estándares. En resumen, 4.5×10^7 primeras células sensibles a HAT se mezclan con 2.8×10^7 segundas células resistentes al HAT que previamente han sido tratadas con dosis letal de inhibidor bioquímico irreversible yodoacetamida (5 mM en solución salina tamponada con fosfato) durante 30 minutos en hielo antes de la fusión. La fusión celular se induce usando polietilenglicol (PEG) y las células se siembran en placas de microcultivo de 96 pocillos. Los cuadromas se seleccionan usando medio que contiene HAT. Los cultivos que contienen anticuerpo biespecífico se identifican usando, por ejemplo, un ELISA específico del isotipo de fase sólida y tinción inmunofluorescente específica para el isotipo.

En una realización de identificación para identificar el anticuerpo biespecífico, los pocillos de las placas de micro-titulación (Falcon, Becton Dickinson Labware) se cubren con reactivo que específicamente interactúa con uno de los anticuerpos de hibridoma parentales y que carece de reactividad cruzada con ambos anticuerpos. Las placas se lavan, bloquean y los sobrenadantes (SN) que se van a probar se añaden a cada pocillo. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante dos horas, los sobrenadantes se descartan, las placas se lavan, y se añaden conjugado de fosfatasa alcalina-antianticuerpo durante dos horas a temperatura ambiente. Las placas se lavan y un sustrato de fosfatasa, por ejemplo, P-Nitrofenil fosfato (Sigma, San Luis) se añade a cada pocillo. Las placas se incuban, se añade 3N de NaOH a cada pocillo para detener la reacción, y se determinan los valores DO_{410} usando un lector de ELISA.

En otra realización de identificación, se usan placas de microtitulación tratadas previamente con poli-L-lisina para unir una de las células diana a cada pocillo, las células se fijan, por ejemplo, usando glutaraldehído al 1%, y los anticuerpos biespecíficos se ensayan para determinar su capacidad de unión con la célula intacta. Además, junto con la presente invención, para identificar cuadromas preferidos pueden usarse FACS, tinción por inmunofluorescencia, anticuerpos específicos de idiotipo, ensayos de competición de unión a antígeno, y otros métodos comunes en la técnica de caracterización de anticuerpos.

Después del aislamiento del cuadroma, los anticuerpos biespecíficos se purifican de otros productos celulares. Esto se puede llevar a cabo mediante una variedad de procedimientos de aislamiento de proteínas, conocidos por los expertos en la técnica de la purificación de inmunoglobulinas. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, 1988).

Por ejemplo, los sobrenadantes de cuadromas seleccionados se pasan sobre columnas de sefarosa G de proteína A o proteína G para unir IgG (dependiendo del isotipo). Los anticuerpos de enlace se eluyen con por ejemplo un tampón de citrato pH 5.0. Las fracciones eluídas que contienen los anticuerpos biespecíficos, se dializan contra un tampón isotónico. De manera alternativa, el eluído también se pasa sobre una columna de sefarosa anti-inmunoglobulina. El anticuerpo biespecífico se eluye entonces con 3.5 M de cloruro de magnesio. Los anticuerpos biespecíficos purificados de esta manera se prueban para determinar su actividad de enlace mediante, por ejemplo, un Ensayo inmunoabsorbente de enzima unida específico de isotipo y ensayo de tinción de inmunofluorescencia de las células diana, como se describió anteriormente.

Los anticuerpos BsAbs purificados y los anticuerpos parentales también se pueden caracterizar y aislar mediante electroforesis SDS-PAGE, seguido por tinción con plata o Coomassie. Esto es posible cuando uno de los anticuerpos parentales tiene un peso molecular más alto que el otro. En donde la banda del anticuerpo biespecífico migra a medio camino entre los dos anticuerpos parentales, la reducción de las muestras verifica la presencia de cadenas pesadas con dos pesos moleculares aparentes diferentes.

H4. Proteínas de Fusión y Expresión Recombinante

Anticuerpos para aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, incluyendo los anticuerpos 9D2 y 3G4 (ATCC 4545) y otros anticuerpos competidores con propiedades mejoradas, y péptidos de unión a la PE, pueden ser usados también para crear proteínas de fusión usando técnicas de biología molecular. Cualquier proteína de fusión se puede diseñar y hacer usando cualquiera de los anticuerpos, péptidos de unión a la FE y segundos o agentes terapéuticos descritos en la presente memoria y aquellos conocidos en la técnica. La tecnología de las proteínas de fusión se adapta fácilmente para preparar las proteínas de fusión con otras modificaciones, tales como optimizaciones en las secuencias CDR, unión mediante una secuencia peptídica selectivamente escindible y similares.

El uso de técnicas de ADN recombinante para lograr estos fines es ahora práctica normal para aquellos con experiencia en la técnica. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinantes *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación en vivo/recombinación genética. Se puede realizar síntesis de ADN y ARN, adicionalmente, usando sintetizadores automatizados (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1989).

La preparación de esta proteína de fusión generalmente conlleva la preparación de una primera y segunda región de codificación de ADN y la unión funcional o unión de estas regiones, en cuadro, para preparar una sola región de codificación que codifica la proteína de fusión deseada. En el presente contexto, la secuencia del anticuerpo se unirá en el cuadro con una secuencia de ADN que codifica una sustancia terapéutica. No se cree generalmente que sea relevante cual porción del inmunoconjugado se prepare como la región N terminal o como la región C terminal.

En cuanto la región de codificación deseada se ha producido, se crea un vector de expresión. Los vectores de expresión contienen uno o más promotores aguas arribade las regiones de ADN insertadas que actúan para promover la transcripción del ADN y de este modo promueve la expresión de la proteína recombinante codificada. Este es el significado de "expresión recombinante".

Para obtener una versión del inmunoconjugado denominada "recombinante", el vector se expresa en una célula recombinante. El diseño técnico de los segmentos del ADN para la expresión en un sistema procariota o eucariota se puede realizar mediante técnicas generalmente conocidas para los expertos en expresión recombinante. Se cree que prácticamente cualquier sistema de expresión se puede emplear en la expresión.

Los inmunoconjugados de la invención se pueden expresar satisfactoriamente en los sistemas de expresión eucariotas, por ejemplo, células CHO, sin embargo, se considera que los sistemas de expresión bacterianos, tales como el pQE-60 de *E. coli* serán particularmente útiles para la preparación a gran escala y la purificación posterior de las construcciones. Los ADNc también se pueden expresar en sistemas bacterianos, expresándose las proteínas codificadas como fusiones con β-galactosidasa, ubiquitina, glutatión S-transferasa de *Schistosoma japonicum*, y similares. Se cree que la expresión bacteriana tendrá ventajas sobre la expresión eucariota en términos de facilidad de uso y cantidad de materiales obtenidos mediante estos.

En términos de expresión microbiana, las Patentes Nos US 5,583,013; 5,221,619; 4,785,420; 4,704,362; y 4,366,246 complementan aún más la presente descripción en relación con la expresión de genes en células huésped recombinantes.

Los inmunoconjugados producidos recombinantemente se pueden purificar y formular para la administración humana. De manera alternativa, los ácidos nucleicos que codifican los inmunoconjugados se pueden administrar vía terapia de genes. Aunque puede emplearse ADN recombinante natural o plásmidos, se prefiere el uso de liposomas o de vectores. La capacidad de ciertos virus para entrar a las células vía endocitosis mediada por receptor y de integrar entre el genoma de la célula huésped y expresar genes virales establemente y eficientemente los ha hecho candidatos atractivos para la transferencia de genes extraños en células de mamíferos. Los vectores de terapia de genes preferidos para su uso en la presente invención generalmente serán vectores virales.

Los retrovirus han prometido vectores de administración de genes debido a su capacidad para integrar sus genes en el genoma del huésped, transfiriendo una gran cantidad de material genético extraño, infectando un espectro amplio de especies y de tipos celulares y empacarse en líneas celulares especiales. Otros virus, tales como los adenovirus, los virus de herpes simple (VHS), el citomegalovirus (CMV), y el virus adenoasociado (VAA), tales como los descritos por la Patente US 5,139,941 (incorporada en la presente memoria como referencia), también se pueden diseñar técnicamente para servir como vectores para la transferencia de genes.

Aunque algunos virus que pueden aceptar material genético extraño se limitan en el número de nucleótidos que pueden acomodar y en el intervalo de células que infectan, estos virus han demostrado que efectúan con éxito la expresión de genes. Sin embargo, los adenovirus no integran su material genético en el genoma del huésped y por lo tanto no requieren la replicación del huésped para la expresión de genes, haciéndolos idealmente adecuados para la expresión de genes de una manera rápida, eficaz y heteróloga. Las técnicas para preparar virus infectivos con replicación defectuosa son más conocidas en la técnica.

En ciertas otras realizaciones adicionales, el vector de terapia de genes será el VHS. Un factor que hace del VHS un vector atractivo es el tamaño y organización del genoma. Debido a que el VHS es grande, la incorporación de múltiples genes o los casetes de expresión es menos problemático que en otros sistemas virales más pequeños. Además, la disponibilidad de diferentes secuencias de control viral con desempeño variante (por ejemplo temporal, fuerza) hace posible controlar la expresión en un grado mayor que en otros sistemas. También es otra ventaja que el virus tenga relativamente pocos mensajes divididos, facilitando adicionalmente las manipulaciones genéticas. El VHS también es relativamente fácil de manipular y se puede desarrollar a titulaciones altas.

Desde luego, al usar sistemas de administración virales, se desearía purificar el virión suficientemente para volverlo esencialmente libre de contaminantes indeseables, tal como partículas virales de interferencia de defectos o pirógenos

de manera que no causen ninguna reacción en la célula, animal o individuo que recibe el construcción del vector. Un medio preferido de purificar al vector implica el uso de gradientes de densidad boyante, tal como centrifugación de gradiente de cloruro de cesio.

I. Ensayos de Unión y Funcionales

Aunque la invención tiene utilidad significativa en regímenes de tratamiento en animales y humanos, también tiene muchos otros usos específicos y verosímiles, incluyendo usos prácticos en muchas realizaciones *in vitro*. Ciertos de estos usos se encuentran relacionados con propiedades de unión específicas de los anticuerpos, péptidos e inmunoconjugados. Como cada uno de las construcciones de la invención incluye al menos un anticuerpo o componente de péptido que se une a un aminofosfolípido y/o a un fosfolípido aniónico, pueden ser usados en una variedad de realizaciones de unión, incluyendo ensayos de unión útiles.
La presencia de un agente unido, en donde sea irrelevante, aunque proporcione ventajosas propiedades, no niega la utilidad del primer anticuerpo o regiones del péptido en algún ensayo de unión.

Los ensayos de unión apropiadamente útiles incluyen aquellos empleados comúnmente en la técnica, tales como los ensayos de inmunotransferencia, transferencia Western, transferencia de puntos, RIAs, ELISAs, inmunohistoquímicos, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, y similares, como se describe adicionalmente en la presente memoria.

Ciertos ensayos de unión estándares son aquellos en los cuales un antígeno es inmovilizado sobre una matriz de soporte sólida, por ejemplo, nitrocelulosa, nailon o una combinación de los mismos, tales como en los ensayos de inmunotransferencia, transferencia de Western, ELISAs y ensayos relacionados. Otros ensayos importantes son aquellos que usan células, donde los componentes de la invención pueden usarse para ensayar las células con aminofosfolípidos y/o fosfolípidos aniónicos en la superficie celular. Esos ensayos pueden aplicarse en el análisis preclínico, por ejemplo, en referencia al diseño de fármacos, analizando el mecanismo de acción y/o seleccionando agentes terapéuticos para usos combinados.

Ensayos *in vitro* adicionales son útiles en la diagnosis de enfermedades relacionadas con la activación de células aberrantes y/o apoptosis, en donde el análisis de la presencia de aminofosfolípidos y/o fosfolípidos aniónicos en la superficie celular sería particularmente útil. Las construcciones pueden usarse entonces junto con bloques de tejidos incluidos en parafina, fijados con formalina y congelados en fresco, en inmunohistoquímica; en la clasificación de células activadas por fluorescencia, en citometría de flujo o en microfluorometría de flujo.

Las construcciones de la invención tienen usos prácticos adicionales en la inmunoprecipitación, realizaciones de purificación del antígeno, tal como cromatografía de afinidad, incluyendo aún casos relacionados con anticuerpos biespecíficos, la purificación rápida de una etapa, de uno o más antígenos a la vez; y en muchos otros ensayos de unión que serán conocidos por los experimentados en la técnica dada la información presentada en la presente memoria.

Otros usos prácticos adicionales de las construcciones de la presente son como controles en ensayos funcionales, incluyendo muchos ensayos y sistemas *in vitro* y ex vivo. Como las propiedades de unión y funcionales de los anticuerpos, péptidos conjugados de la invención son particularmente específicos, tal como se describe en la presente memoria, esos usos de "control" son realmente extremadamente valiosos. Los ensayos que se benefician de esa aplicación práctica de la invención incluyen, por ejemplo, ensayos concernientes a la detección de aminofosfolípidos y/o fosfolípidos aniónicos en la superficie celular. Estos sistemas de ensayos pueden ser desarrollados también en ensayos de selección de fármacos *in vitro* o ex vivo, en donde el presente suministro de materiales biológicos con propiedades bien definidas sea particularmente importante. Por ejemplo, en el uso de las construcciones de la invención como controles positivos en la selección de moléculas pequeñas que tengan propiedades de unión similares, equivalentes o mejoradas, por ejemplo, en la selección y desarrollo de fármacos.

J. Composiciones farmacéuticas

Los agentes terapéuticos de la invención serán formulados generalmente como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas comprenderán una cantidad biológica o terapéuticamente eficaz, de al menos un primer agente terapéutico de la invención, disuelto o disperso en un transportador farmacéuticamente aceptable o medio acuoso. Terapéuticas combinadas también se contemplan, con el mismo tipo de composiciones farmacéuticas subyacentes se pueden emplear tanto para medicamentos solos y combinados.

Las frases "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o de otro modo cuando se administra a un animal, o a un humano, según sea lo adecuado. Los usos veterinarios se incluyen igualmente dentro de la invención y las formulaciones "farmacéuticamente aceptables" incluyen formulaciones tanto para uso clínico como veterinario.

Como se usa en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, sustancias antibacterianas y antifúngicas, sustancias retardadoras

isotónicas y de absorción y similares. El uso de estos medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es muy conocido en la técnica. Excepto que algún medio convencional o agente sea incompatible con el ingrediente activo, su uso en las composiciones terapéuticas se contempla. Para la administración humana, las preparaciones deberán cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza que se requieren por la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA. Los ingredientes activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Las formulaciones de "dosis unitarias" son las que contienen una dosis o subdosis del ingrediente administrado para un suministro en un tiempo particular. Por ejemplo, las formulaciones de "dosis unitaria" son las que contienen una dosis diaria o unidad o subdosis diaria o una dosis semanal o unidad o subdosis semanal y así sucesivamente.

J1. Formulaciones Inyectables

Los agentes terapéuticos de la invención serán formulados a menudo para administración parenteral, particularmente para el tratamiento de tumores, por ejemplo, formuladas para inyección mediante las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, u otras vías, incluyendo la administración peristáltica y la instilación directa en un tumor o sitio de enfermedad (administración intracavidad). La preparación de una composición acuosa que contiene un anticuerpo, inmunoconjugado o conjugado de péptido, como un ingrediente activo, será conocida para los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Típicamente, estas composiciones se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; las formas sólidas convenientes para su uso para preparar soluciones o suspensiones después de la adición de un líquido antes de la inyección también se pueden preparar; y las preparaciones también pueden emulsionarse.

Las formas farmacéuticas convenientes para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones; formulaciones que incluyen aceite de ajonjolí, aceite de cacahuate o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma deberá ser estéril y fluida al grado de que salga de la jeringa. Deberá ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deberá preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Los agentes terapéuticos se pueden formular en una composición acuosa estéril en una forma neutra o de sal. Las soluciones de agentes terapéuticos como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua convenientemente mezclada con un agente tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres de la proteína), y las que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos como acético, trifluoroacético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos, y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

Los transportadores convenientes incluyen solventes y medios de dispersión que contienen, por ejemplo agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas convenientes de los mismos, y aceites vegetales. En muchos casos, será preferible incluir sustancias isotónicas, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y/o por el uso de agentes tensioactivos.

En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, todas estas preparaciones deberán contener un conservador para evitar el crecimiento de microorganismos. La prevención de la acción de microorganismos se puede llevar a cabo por varias sustancias antibacterianas y antifúngicas, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo mediante el uso de composiciones de sustancias que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Antes de o después de la formulación, los agentes terapéuticos deberán dializarse extensamente para eliminar moléculas de peso molecular pequeñas indeseables, y/o liofilizar para la formulación más fácil en el vehículo deseado, cuando sea apropiado. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando las sustancias activas en la cantidad requerida en el solvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, como se desee, seguido por esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los distintos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente.

En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y técnicas de secado por congelación que producen un polvo de ingrediente activo, más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución filtrada estéril previamente de la misma.

Las composiciones farmacéuticas convenientes de acuerdo con la invención generalmente incluirán una cantidad del agente terapéutico mezclado con un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como solución acuosa

estéril, para dar un intervalo de concentraciones finales, dependiendo del uso de destino. Las técnicas de preparación generalmente son muy conocidas en la técnica como se ejemplifica por Remington Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed. Mack Publishing Company, 1980, incorporada en la presente memoria como referencia. Para la administración humana, las preparaciones deberán satisfacer esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y estándares de pureza como se requiere por la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA. Después de la formulación, los agentes terapéuticos se administrarán de una manera compatible con la formulación de la dosis en una cantidad tal que sea eficaz terapéuticamente.

J2. Formulaciones de Liberación Sostenida

Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificaciones, tales como del tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se contemplan otras formas aceptables farmacéuticamente, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas u otros sólidos para administración oral, supositorios, pesarios, soluciones nasales o rociadores, aerosoles, inhalantes, formulaciones tópicas, formas liposomales y similares. El tipo de forma para la administración se acoplará a la enfermedad o padecimiento que va a tratarse.

Se pueden usar composiciones o preparaciones farmacéuticas en cápsulas de "liberación lenta" o de "liberación sostenida". Las formulaciones de liberación lenta generalmente se diseñan para dar un nivel de fármaco constante durante un período extenso y se pueden usar para administrar agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención. Las formulaciones de liberación lenta típicamente se implantan en la vecindad del sitio de enfermedad, por ejemplo en el sitio de un tumor o infección viral.

Ejemplos convenientes de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen agentes terapéuticos, cuyas matrices están en la forma de artículos con forma, v.gr., películas o microcápsula. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres; hidrogeles, por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol); poliactidas, por ejemplo, Patente US No 3,773,919; copolímeros de ácido L- glutámico y gama etil-L-glutamato; copolímeros de etilenoacetato de vinilo no degradable; copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradable, tales como el Lupron Depot® (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide); y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Aunque los polímeros tales como el etilenoacetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten liberar moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, reduciendo de este modo la actividad biológica y/o cambiando la inmunogenicidad. Están disponibles estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación involucra la formación del enlace S-S intermolecular a través de intercambio tiodisulfuro, se logra la estabilización modificando los restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando los aditivos adecuados, desarrollando composiciones de matriz de polímero específicas, y similares.

J3. Liposomas y Nanocápsulas

En ciertas realizaciones, también se pueden emplear liposomas y/o nanocápsulas con los agentes terapéuticos. La formación y uso de los liposomas es generalmente conocido para los expertos en la técnica, como se resume más adelante. La invención proporciona combinaciones de anticuerpos, liposomas y agentes quimioterapéuticos, particulares, que se describen posteriormente. Además se puede usar una formulación liposomal como un componente de rutina de cualquiera de los agentes terapéuticos de toda la invención.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que están dispersos en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de bicapa concéntrica de láminas múltiples (también denominadas vesículas de láminas múltiples (MLV)). Las vesículas de láminas múltiples generalmente tienen diámetros de desde 25 nm hasta 4 µm. La exposición a ultrasonidos de las vesículas de láminas múltiples da como resultado la formación de vesículas de una sola lámina pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 A, que contienen una solución acuosa en el núcleo.

Los fosfolípidos pueden formar una variedad de estructuras distintos de liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la proporción molar de lípido al agua. En proporciones bajas el liposoma es la estructura preferida. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, de la fuerza iónica y de la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden mostrar baja permeabilidad a sustancias iónicas y polares, pero a temperaturas elevadas sufren una transición de fase que altera de manera remarcable su permeabilidad. La transición de fase involucra un cambio desde una estructura ordenada, muy empacada, conocida como estado de gel, a una estructura menos ordenada, empacada flojamente, conocida como estado fluido. Eso se presenta en una temperatura de transición de fase característica y da como resultado un incremento en la permeabilidad a los iones, azúcares y fármacos.

Los liposomas interactúan con células vía cuatro mecanismos diferentes: endocitosis por células fagocíticas del sistema retículo endotelial tales como macrófagos y neutrófilos; adsorción a la superficie celular, ya sea mediante

fuerzas hidrofóbicas o electroestáticas débiles no específicas, o mediante interacciones específicas con componentes de la superficie celular; la fusión con la membrana celular del plasma mediante la inserción de la bicapa de lípidos de liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea de contenidos liposomales en el citoplasma; y mediante la transferencia de lípidos liposomales a las membranas celulares o subcelulares, o viceversa, sin ninguna asociación del contenido de liposoma. Variando la formulación de liposoma puede alterarse qué mecanismo es operativo aunque más de uno puede operar al mismo tiempo.

Las nanocápsulas generalmente atrapan compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos laterales debido a la sobrecarga polimérica intracelular, tal como partículas ultrafinas (con tamaños alrededor de 0.1 µ) deberán diseñarse usando polímeros capaces de ser degradados en vivo. Las nanopartículas de polialquilcianoacrilato biodegradables que satisfacen estos requisitos se contemplan para su uso en la presente invención y estas partículas se pueden fabricar fácilmente.

J4. Formulaciones Oftálmicas

Muchas enfermedades de los ojos, particularmente aquellas que tienen un componente angiogénico, pueden ser tratadas mediante la presente invención. Por ejemplo la enfermedad neovascular ocular, la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética, la retinopatía de premadurez, el rechazo al injerto de córnea, el glaucoma neovascular, las fibroplasias retrolentales y otras enfermedades asociadas con la neovascularización de la córnea o la neovascularización retinal/coroidal, como se describe posteriormente en la presente memoria.

Los agentes terapéuticos de la invención se pueden emplear ventajosamente en la preparación de composiciones farmacéuticas convenientes para su uso como soluciones oftálmicas, incluyendo las de administración intravítrea y/o intracameral. Para el tratamiento de cualquiera de los anteriores u otros padecimientos los agentes terapéuticos se administran al ojo o a los ojos del sujeto que los necesite en forma de una preparación oftálmica preparada de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional, véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, págs. 1488 a 1501 (Mack Publishing Co., Easton, PA).

Las preparaciones oftálmicas contendrán un agente terapéutico en una concentración de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.5 por ciento en una solución farmacéuticamente aceptable, suspensión o ungüento. Alguna variación en la concentración necesariamente se presentará, dependiendo del compuesto empleado, el estado del sujeto que se va a tratar y similares, y la persona responsable para el tratamiento determinará la concentración más conveniente para el sujeto individual. La preparación oftálmica preferiblemente estará en forma de una solución acuosa estéril que contiene, si se desea, ingredientes adicionales, por ejemplo conservantes, tampones, agentes de tonicidad, antioxidantes y estabilizantes, agentes no iónicos humectantes o clarificantes, agentes que aumentan la viscosidad y similares.

Los conservantes convenientes para su uso en dicha solución incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, clorobutanol, timerosal y similares. Los tampones convenientes incluyen ácido bórico, bicarbonato de sodio y de potasio, boratos de sodio y de potasio, carbonato de sodio y de potasio, acetato de sodio, bifosfato de sodio y similares, en cantidades suficientes para mantener el pH a entre aproximadamente pH 6 y pH 8, preferiblemente entre aproximadamente pH 7 y pH 7.5. Las sustancias de tonicidad convenientes son dextran 40, dextran 70, dextrosa, glicerina, cloruro de potasio, propilenglicol, cloruro de sodio, y similares, de manera que el cloruro de sodio equivalente de la solución oftálmica está en el intervalo de 0.9 más o menos 0.2%.

Los antioxidantes y estabilizantes convenientes incluyen bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfito de sodio, tiourea y similares. Sustancias convenientes humectantes y clarificantes incluyen polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 282 y tiloxapol. Las sustancias que aumentan la viscosidad convenientes incluyen dextran 40, dextran 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, vaselina, polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa y similares. La preparación oftálmica se administrará tópicamente al ojo del sujeto que necesita el tratamiento mediante métodos convencionales. Por ejemplo, en forma de gotas o bañando el ojo en la solución oftálmica.

J5. Formulaciones tópicas

En el sentido más amplio, las formulaciones para la administración tópica incluyen aquellas para la administración en la boca (bucal) y a través de la piel. Los "sistemas de administración tópica" también incluyen parches transdérmicos que contienen el ingrediente que se va a administrar. La administración a través de la piel se puede lograr adicionalmente por iontoforesis o electrotransporte, si se desea.

Las formulaciones convenientes para la administración tópica en la boca incluyen grageas que comprenden los ingredientes en una base con sabor, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente que se va a administrar en un transportador líquido conveniente.

Las formulaciones convenientes para la administrar tópica en la piel incluyen ungüentos, cremas, geles y pastas que comprenden el ingrediente que se va a administrar en un transportador farmacéuticamente aceptable. La formulación de agentes terapéuticos para uso tópico, tal como en cremas, pomadas y geles, incluyen la preparación de bases de pomada oleaginosa o soluble en agua, así como es bien conocido en la técnica en vista a la presente descripción. Por ejemplo, estas composiciones pueden incluir aceites vegetales, grasas animales, y más preferiblemente, hidrocarburos semisólidos obtenidos del petróleo. Componentes particulares usados pueden incluir pomada blanca, pomada amarilla, cera de cetil ésteres, ácido oleico, aceite de oliva, parafina, vaselina, vaselina blanca, esperma de ballena, glicerita de almidón, cera blanca, cera amarilla, lanolina, lanolina anhidra y monoestearato de glicerilo. Varias bases de pomada solubles en agua también se pueden usar, incluyendo ésteres de glicol y derivados, polietilenglicoles, polioxil 40 estearato y polisorbatos.

Las formulaciones para la administración rectal se pueden presentar como un supositorio con una base conveniente que comprende, por ejemplo manteca de cacao o un salicilato. Las formulaciones convenientes para la administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones para pulverización que contienen, además del ingrediente activo, transportadores como se conocen en la técnica que son adecuados.

J6. Formulaciones Nasales

Se contempla la administración local mediante la vía nasal y respiratoria para tratar varios padecimientos, particularmente para el uso en los métodos de tratamiento antivirales de la presente invención. Estas vías de administración también son convenientes para administrar sustancias en la circulación sistémica. Las formulaciones de ingredientes activos en transportadores convenientes para la administración nasal por lo tanto se incluyen dentro de la invención, por ejemplo, soluciones nasales, pulverizaciones, aerosoles e inhalantes. Cuando el vehículo es un sólido, las formulaciones incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micras, que se administra, por ejemplo, mediante la inhalación rápida a través de las fosas nasales desde un envase con el polvo que se sujeta cerca de la nariz.

Las formulaciones convenientes en las que el transportador es un líquido son útiles en la administración nasal. Las soluciones nasales usualmente son soluciones acuosas diseñadas para administrarse a las fosas nasales en gotas o pulverizaciones y se preparan de manera que son similares en muchos aspectos a las secreciones nasales, de manera que se mantiene la acción ciliar normal. De este modo, las soluciones nasales acuosas usualmente son isotónicas y ligeramente tamponadas para mantener un pH de 5,5 a 6,5. Además, si se requiere, en la formulación pueden incluirse conservantes antimicrobianos, similares a los usados en preparaciones oftálmicas, y estabilizantes de fármacos adecuados. Se conocen diversas preparaciones nasales comerciales e incluyen, por ejemplo, antibióticos y antihistaminas y se usan para la profilaxis del asma.

Inhalaciones e inhalantes son preparaciones farmacéuticas diseñadas para administrar un fármaco o compuesto en el árbol respiratorio de un paciente. Un vapor o niebla se administra y alcanza el área afectada. Esta ruta también se puede emplear para administrar sustancias a la circulación sistémica. Las inhalaciones se pueden administrar por la vía nasal o respiratoria oral. La administración de soluciones de inhalación sólo es eficaz si las gotas son suficientemente finas y de tamaño uniforme para que la niebla alcance los bronquiolos.

Otro grupo de productos, también conocido como inhalaciones, y algunas veces denominado insuflaciones, comprende fármacos en polvo muy fino o líquidos que se llevan a las vías respiratorias mediante el uso de sistemas de administración especiales, tales como aerosoles farmacéuticos, que mantienen una solución o suspensión del fármaco en un propulsor de gas licuado. Cuando se libera a través de una válvula y un adaptador oral conveniente, se impulsa una dosis de inhalación medida a la vía respiratoria del paciente. El tamaño de las partículas es de gran importancia para la administración de este tipo de preparación. Se ha indicado que el tamaño óptimo de las partículas para la penetración en la cavidad pulmonar es del orden de 0,5 a 7 µ. Las nebulizaciones finas se producen con aerosoles presurizados y por lo tanto su uso se considera ventajoso.

K. Kits de Diagnóstico y Terapéuticos

Esta invención también proporciona kits de diágnostico y terapéuticos que comprenden al menos un primer agente terapéutico de la presente invención, es decir, un anticuerpo, inmunoconjugado o conjugado de péptido, que se une a un fosfolípido aniónico o aminofosfolípido, para su uso en los métodos de tratamiento, métodos de tratamiento combinados y/o realizaciones de formación de imágenes y tratamiento. Estos kits generalmente contendrán; en al menos un primer envase (o medio de envase), una formulación farmacéuticamente aceptable de al menos un agente terapéutico, un anticuerpo, inmunoconjugado o conjugado de péptido, que se una a un fosfolípido aniónico o aminofosfolípido. Los kits pueden incluir instrucciones escritas o electrónicas para su uso, por ejemplo, en realizaciones preclínicas, clínicas y/o veterinarias.

Los kits también pueden contener otras composiciones, formulaciones y agentes biológicos y terapéuticos secundarios farmacéuticamente aceptables, incluyendo aquellos para la terapia combinada y/o para el diagnóstico y formación de imágenes. Por ejemplo, dichos kits pueden contener alguno o más de una gama de agentes quimioterapéuticos,

radioterapéuticos o antiangiogénicos, células antitumorales, vasculatura antitumoral o anticuerpos de estromas antitumorales, inmunotoxinas o coaguligandos, agentes antivirales y/o componentes o agentes de diagnóstico. También pueden incluirse instrucciones escritas o electrónicas para su uso en terapia combinada y/o para la diagnosis y formación de imágenes.

Los kits pueden tener un solo envase que contenga el primer anticuerpo, inmunoconjugado o conjugado de péptido, que se una a un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, con o sin componentes adicionales, o pueden tener distintos envases para cada agente deseado. Cuando se proporcionan agentes terapéuticos combinados, se puede premezclar una sola solución, ya sea en una combinación equivalente molar, o con un componente en exceso del otro. De manera alternativa, el agente terapéutico primario de la invención y el segundo agente biológico o terapéutico, tal como un segundo agente anticanceroso o antiviral, del kit se puede mantener por separado dentro de envases distintos del kit antes de la administración a un paciente.

Los componentes de diagnóstico se mantendrán más frecuentemente, en al menos un segundo envase, distinto al otro envase o al primer envase que comprenda el uno o más agentes terapéuticos. Los kits de diagnóstico pueden incluir anticuerpos o péptidos marcados que se unan al mismo aminofosfolípido o fosfolípido aniónico que el agente terapéutico primario, o cualquier otro agente apropiado para la diagnosis de la enfermedad que vaya a ser tratada. Los kits pueden incluir agentes de diagnóstico para el uso *in vitro*, *in vivo*, o ambos de esos agentes. Los kits pueden incluir instrucciones escritas o electrónicas para su uso, por ejemplo, en realizaciones de diagnóstico preclínicas, clínicas y/o veterinarias.

Para la inmunodetección *in vitro*, los anticuerpos pueden unirse a un soporte sólido, así como a una placa de microtitulación, aunque se prefieren soluciones o polvos para reconstitución de anticuerpos. Los kits para inmunodetección comprenden al menos un primer reactivo para inmunodetección. Los reactivos para inmunodetección del kit pueden tomar cualquier variedad de formas, incluyendo aquellos marcadores detectables que se encuentran asociados o relacionados con el anticuerpo determinado, tal como se usa *in vivo*. Los marcadores detectables que se encuentran asociados o unidos a un ligando de unión secundario, también se contemplan. Ligandos secundarios ejemplares son aquellos anticuerpos secundarios que tienen afinidad de unión por el primer anticuerpo.

Reactivos de inmunodetección apropiados, adicionales, para el uso en los kits de la presente, incluyen el reactivo de dos componentes, que comprende un anticuerpo secundario que tiene una afinidad de unión por el primer anticuerpo, junto con un tercer anticuerpo que tiene una afinidad de unión por el segundo anticuerpo, el tercer anticuerpo se encuentra enlazado a un marcador detectable. Cierto número de marcadores ejemplares son conocidos en la técnica y todos esos marcadores pueden ser empleados con relación a la invención. Estos kits pueden contener conjugados de anticuerpo-marcador ya sea en una forma totalmente conjugada, en la forma de intermediarios, o como porciones separadas que van a ser conjugadas por el usuario del kit. Los kits para formación de imágenes comprenderán preferentemente un agente de localización dirigida del objetivo o un anticuerpo que se encuentre ya unido a un marcador detectable *in vivo*. Sin embargo, el nivel y medios de unión podrían ser suministrados en forma separada.

Cualquier forma de kits de diagnóstico puede comprender además agentes de control tales como composiciones biológicas proporcionadas convenientemente como alícuotas, ya sea marcadas o no marcadas, que puedan usarse para preparar una curva estándar para un ensayo de detección. Los componentes de los kits pueden ser empacados ya sea en medios acuosos o en forma liofilizada.

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una o más soluciones líquidas, la solución líquida preferiblemente es una solución acuosa, siendo particularmente preferida la solución acuosa estéril. Sin embargo, los componentes del kit se pueden proporcionar como polvos secos. Cuando los reactivos o componentes se proporcionan como polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un solvente conveniente. El solvente también puede proporcionarse en otro envase dentro del kit.

Los envases de los kits terapéuticos y de diagnóstico generalmente incluirán cuando menos un frasco, tubo de prueba, ampolleta, botella, jeringa u otro elemento de envase, en el cual el agente terapéutico y cualquier otro agente deseado se puedan colocar y convenientemente se puedan tomar en alícuotas. Como se prefieren al menos dos componentes separados, los kits incluirán preferentemente al menos dos de esos envases. Los kits también pueden contener un tercer o cuarto envase para contener una solución tampón farmacéuticamente aceptable u otro diluyente.

Los kits también puede contener un elemento mediante el cual se administren los agentes terapéuticos a un animal o paciente, por ejemplo, una o más agujas o jeringas, o incluso un cuentagotas para los ojos, una pipeta, u otro de estos aparatos parecidos, a partir de los cuales la formulación se puede inyectar en el animal o aplicarse a una área enferma del cuerpo. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener los viales, o cualquier otro componente, herméticamente cerrado para la venta comercial, tal como, por ejemplo, envases de plástico moldeado por soplado o por inyección en los que se colocan y sujetan los viales y otros aparatos deseados.

L. Inmunodetección y formación de imágenes

La presente invención proporciona además métodos de diagnóstico y de formación de imágenes *in vitro* e *in vivo*. Estos métodos son aplicables para su uso para generar información de diagnóstico, pronóstico o información de imagen, por ejemplo, relacionada con enfermedades angiogénicas e infecciones virales, y preferentemente relacionada con el tratamiento y métodos para la formación de imágenes, de tumores. Los métodos de la invención incluyen pruebas de diagnóstico *in vitro*, por ejemplo, donde las muestras se puedan obtener no invasivamente y se prueben en ensayos de producción alta y/o cuando el diagnóstico clínico sea ambiguo y la confirmación se desea. En el campo del diagnóstico y formación de imágenes *in vivo*, los anticuerpos, y péptidos de la invención se encuentran unidos a uno o más agentes detectables y se usan para formar una imagen de un sitio o tumor angiogénico, opcionalmente como una primera etapa antes del tratamiento.

L1. Métodos y Kits de Inmunodetección

La invención concierne entonces a métodos de inmunodetección para unir, purificar, cuantificar o de otro modo detectar generalmente aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, por ejemplo, para el uso en la diagnosis de células activadas y apoptóticas y enfermedades asociadas. Los anticuerpos de la invención, tales como el 9D2 y 3G4 (ATCC 4545) se pueden emplear para detectar fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos (véase más adelante), en muestras de tejido aislado, biopsias o frotis y/o en muestras de tejido homogenizado. Estos métodos de inmunodetección tienen utilidad de diagnóstico evidente, pero también tienen aplicaciones para muestras no clínicas tales como en la titulación de muestras de antígenos, y similares.

Los etapas de varios métodos de inmunodetección útiles se han descrito en la bibliografía científica, tales como por ejemplo, Nakamura *et al.*, 1987, incorporada específicamente en la presente memoria como referencia. En general, los métodos de inmunoenlace incluyen obtener una muestra que se sospecha que contenga aminofosfolípidos y/o fosfolípidos aniónicos, preferentemente células de las cuales se sospecha que tienen aminofosfolípidos y/o fosfolípidos aniónicos en la superficie celular, y poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo de la invención, tal como 9D2 o 3G4 (ATCC 4545), en condiciones eficaces para permitir la formación de complejos inmunes. Después, se detecta cualquiera de los complejos inmunes formados durante el proceso de unión y preferentemente se cuantifica.

La muestra analizada puede ser una muestra de células, tales como células expuestas a ciertas condiciones de prueba en el laboratorio. La muestra puede ser también una muestra biológica de un animal o paciente, por ejemplo, uno del cual se sospeche que tiene una enfermedad asociada con la activación o apoptosis de uno o más tipos de células. Esa muestra puede ser una sección o espécimen de tejido, una biopsia, un frotis o mancha dejada en un sitio, un extracto de tejido homogenizado o formas separadas o purificadas de los mismos.

Al poner en contacto la muestra biológica elegida con el anticuerpo en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunes (complejos inmunes primarios) generalmente es cuestión de simplemente añadir el anticuerpo a la muestra e incubar la mezcla durante un periodo de tiempo suficientemente largo para que los anticuerpos formen complejos inmunes, con, por ejemplo que se enlacen con, cualquier fosfolípido aniónico y aminofosfolípido presente. Después de este tiempo, la composición de anticuerpo de muestra, tal como un sección de tejido o una placa ELISA, generalmente se lavará para eliminar cualquier especie de anticuerpo enlazado no específicamente, permitiendo que solamente los anticuerpos específicamente enlazados dentro de los complejos inmunes primarios se detecten.

La detección de formación de inmunocomplejos es muy conocida en la técnica y se puede lograr a través de la aplicación de numerosos enfoques. Estos métodos generalmente se basan en la detección de una etiqueta o marcador, tal como cualquier marcador o etiqueta radioactivo(a), fluorescente, biológico(a) o enzimático(a) conocido en la técnica. Las Patentes US 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4, 277,437; 4,275,149 y 4,366,241. El uso de enzimas que generan un producto coloreado después del contacto con un sustrato cromogénico se prefieren generalmente. Los ligandos de enlace secundario, tal como un segundo anticuerpo o un arreglo de enlace de ligando biotina/avidina, también se puede usar, como se conoce en la técnica.

Los anticuerpos de la invención, tales como el 9D2 y 3G4 (ATCC 4545), empleados en la detección, pueden ellos mismos unirse a un marcador detectable, donde uno podría simplemente detectar un marcador, permitiendo mediante esto la cantidad de complejos inmunes primarios en la composición a ser determinados.

Preferiblemente, los complejos inmunes primarios se detectan por medio de un segundo ligando de enlace que tiene afinidad de enlace para los anticuerpos de la invención. En estos casos, el segundo ligando de enlace se puede unir a un nivel detectable. El segundo ligando de enlace mismo frecuentemente es un anticuerpo, y puede de este modo denominarse un anticuerpo "secundario". Los complejos inmunes primarios se ponen en contacto con el ligando de enlace secundario, marcado, o anticuerpo en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunes secundarios. Los complejos inmunes secundarios generalmente se lavan para eliminar cualquier anticuerpo o ligando secundario marcado específicamente no unido y el marcador restante en los complejos inmunes secundarios se detecta entonces.

Métodos adicionales incluyen la detección de complejos inmunes primarios mediante un enfoque de dos etapas. Un segundo ligando de enlace tal como un anticuerpo, que tiene afinidad de enlace para el primer anticuerpo se usa para

formar complejos inmunes secundarios, como se describió antes. Después de lavar, los complejos inmunes secundarios se ponen en contacto con un tercer ligando de enlace o anticuerpo que tiene afinidad de enlace para el segundo anticuerpo, de nuevo en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunes (complejos inmunes terciarios). El tercer ligando o anticuerpo se une con un marcador detectable, permitiendo la detección de los complejos inmunes terciarios así formados. Este sistema puede proporcionar la amplificación de la señal si se desea.

La diagnosis o monitorización clínica puede ser aplicada a pacientes con una variedad de enfermedades, particularmente aquellas asociadas con la exposición aumentada a aminofosfolípidos y/o fosfolípidos aniónicos, en la superficie celular. La detección de un aminofosfolípido y/o fosfolípido aniónico, o un incremento en los niveles de un amino- fosfolípido y/o fosfolípido aniónico, en comparación con los niveles en una muestra biológica correspondiente de un sujeto anormal, indica que se trata de un paciente con esa enfermedad.
Sin embargo, como saben los expertos en la técnica, este diagnóstico clínico no es probable que se hiciera con base en este método en aislamiento. Aquellos con experiencia en la técnica están muy familiarizados con la diferenciación entre la expresión significativa de un biomarcador, que representa una identificación positiva, y la expresión a bajo nivel o de fondo de un biomarcador. De hecho, los niveles de expresión de fondo frecuentemente se usan para formar un "corte" por encima del cual el aumento de tinción se puntuará como significativo o positivo.

L2. Formación de Imágenes *In Vivo*

La invención proporciona una variedad de realizaciones de diagnóstico y formación de imágenes *in vivo*. Ciertos aspectos de la invención conciernen a nuevas y sorprendentemente eficaces composiciones para la diagnosis y formación de imágenes *in vivo*. Por ejemplo, cualquiera o más del panel de nuevos anticuerpos anti-FS de la invención, preferentemente los anticuerpos 9D2 o 3G4 (ATCC 4545) o anticuerpos competidores con propiedades similares se encuentran enlazados a un agente detectable *in vivo* para formar un conjugado para inmunodiagnóstico de la invención. Aunque los anticuerpos representan un desarrollo importante en el campo, los inmunodiagnósticos resultantes pueden ser usados ahora en cualquier realización de diagnóstico o formación de imágenes, previamente descrita, relacionada con la detección de un aminofosfolípido y/o fosfolípido aniónico.

A este respecto, los compuestos para inmunodiagnóstico que comprenden un anticuerpo de la invención, incluyendo los anticuerpos 9D2 o 3G4 (ATCC 4545) o anticuerpos competidores con propiedades similares, pueden ser usados en la formación de imágenes de trombosis vascular, particularmente en el corazón o cerca del mismo, tal como en la trombosis de venas profundas, embolia pulmonar, infarto del miocardio, fibrilación atrial, problemas con materiales cardiovasculares protésicos, embolia y similares. Esas composiciones de la invención pueden ser usadas en la formación de imágenes en las plaquetas activadas, por ejemplo, en condiciones tales como abscesos, restenosis, inflamación de las articulaciones y en trastornos hemostáticos, tales como trombosis arterial, coronaria, venosa y trombosis cerebral, y similares. Las composiciones para inmunodiagnóstico de la invención, preferentemente aquellas que comprenden los anticuerpos 9D2 o 3G4 (ATCC 4545) o anticuerpos competidores con propiedades similares, pueden ser usadas también en la detección de células apoptóticas, a la vez que pueden ser usadas en la diagnosis y formación de imágenes de una variedad de enfermedades en las cuales ocurre una apoptosis incrementada o inapropiada.

La invención proporciona además una variedad de nuevos métodos para la diagnosis y formación de imágenes *in vivo*, que no se encuentra limitado al uso del panel de anticuerpos proporcionado en la presente memoria. Por ejemplo, en vista al inesperado descubrimiento de que los fosfolípidos aniónicos tales como FI, AF y FG son marcadores accesibles y los cuales pueden ser objetivo de la vasculatura de tumores de manera estable, la invención proporciona métodos para la diagnosis y formación de imágenes de tumores, que comprenden la administración de un agente de inmunodiagnóstico que se une a FI, AF o FG, que se localizará específicamente a la vasculatura de tumores sólidos. Además, ahora pueden ser detectadas células infectadas viralmente, y pueden diagnosticarse infecciones virales, usando un conjugado para inmunodiagnóstico que se une a un aminofosfolípido y/o a un fosfolípido aniónico, tal como FS, FE, FI, AF y FG y preferentemente FS y FE.

Las composiciones y métodos para la formación de imágenes *in vivo*, de la invención, pueden ser usadas en la formación de imágenes de por sí, en la formación de imágenes previa, de un sitio en el cuerpo, para formar una imagen confiable antes del tratamiento. Preferentemente la formación de imágenes es la formación de imágenes de un tumor. Estas composiciones y métodos pueden ser aplicadas también a la formación de imágenes y diagnosis de otras enfermedades o condiciones asociadas con aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, tales como aquellas que involucran la activación y/o apoptosis de células, incluyendo enfermedades angiogénicas, aterosclerosis, infecciones virales, y otras de esas condiciones de las cuales se desee una imagen interna para propósitos de diagnóstico o pronóstico, o para el diseño de un tratamiento.

En estas realizaciones, anticuerpos y péptidos, preferentemente los anticuerpos de la invención, tales como el 9D2, 3G4 (ATCC 4545) y anticuerpos similares, están unidos funcionalmente enlazados o conjugados a un marcador detectable. Los "marcadores detectables" son compuestos o elementos que pueden detectarse debido a sus propiedades funcionales específicas o características químicas, el uso de los cuales permite que el componente al que están unidos se detecte, y se cuantifique además si se desea. En los conjugados de anticuerpos y péptidos para

protocolos de diagnóstico *in vivo* o "métodos de formación de imágenes", los marcadores pueden ser detectados usando métodos no invasivos.

En la técnica se conocen muchos agentes adecuados para la formación de imágenes, como son los métodos para su unión con anticuerpos y ligandos de enlace (véase, por ejemplo, las Patentes US Nos 5,021,236 y 4,472,509). Ciertos métodos de unión implican el uso de un complejo quelado de metal que emplea, por ejemplo, un agente quelante orgánico tal como un DTPA unido al anticuerpo (Patente US 4,472,509). Los anticuerpos monoclonales también se pueden hacer reaccionar con una enzima en presencia de un agente de acoplamiento tal como un glutaraldehído o peryodato. Los conjugados con marcadores de fluoresceína se preparan en presencia de estas sustancias de acoplamiento o mediante la reacción con un isotiocianato.
Un ejemplo de marcadores detectables son los iones paramagnéticos. En este caso, los iones convenientes incluyen cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III), y erbio (III), siendo particularmente preferido el gadolinio.

Los iones útiles en otros contextos, tales como para formación de imágenes en rayos X, incluyen pero no se limitan a lantano (III), oro (III), plomo (II), y especialmente bismuto (III). Los niveles fluorescentes incluyen rodamina, fluoresceína y renografina. La rodamina y la fluoresceína frecuentemente se unen vía un intermediario de isotiocianato.

En el caso de isótopos radioactivos para aplicaciones de diagnóstico, los ejemplos convenientes incluyen ^{14}carbono, ^{51}cromo, ^{36}cloro, ^{57}cobalto, ^{58}cobalto, ^{67}cobre, ^{152}eu, ^{67}galio, ^{3}hidrógeno, ^{123}yodo, ^{125}yodo, ^{131}yodo, ^{111}indio, ^{59}hierro, ^{32}fósforo, ^{186}renio, ^{188}renio, ^{75}selenio, ^{35}azufre, ^{99m}tecnetio, ^{90}itrio. El ^{125}yodo frecuentemente es el preferido para su uso en ciertas realizaciones, y el ^{99m}tecnecio y el ^{111}indio frecuentemente también se prefieren debido a su baja energía y conveniencia para la detección en un intervalo extenso.

Los anticuerpos y péptidos marcados radioactivamente para su uso en la presente invención se pueden producir de conformidad con métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, los grupos funcionales intermediarios que frecuentemente se usan para unir iones metálicos radioisotópicos con anticuerpos son ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA).

Los anticuerpos monoclonales pueden ser yodados por contacto con yoduro de potasio o de sodio y un agente oxidante químico tal como hipoclorito de sodio, o una sustancia oxidante enzimática tal como lactoperoxidasa. Los anticuerpos antitumorales de acuerdo con la invención se pueden marcar con tecnecio^{99m} mediante un proceso de intercambio de ligando, por ejemplo, reduciendo el pertecnato con solución estannosa, quelando el tecnecio reducido sobre una columna de Sefadex y aplicando el anticuerpo a esta columna; o mediante técnicas de marcado directo, por ejemplo, incubando pertecnato, una sustancia reductora tal como $SNCl_2$, una solución tampón tal como solución de ftalato de sodio-potasio, y el anticuerpo.

Cualquier tipo anterior de anticuerpos y ligandos de unión, marcados de manera detectable, puede usarse en los aspectos de formación de imágenes de la invención, ya sea para la formación de imágenes únicamente o para formar una imagen de un sitio de enfermedad o tumor antes del tratamiento. En cualquier forma los métodos comprenden administrar a un animal o paciente una cantidad eficaz, desde el punto de vista de diagnóstico, de un anticuerpo o ligando de unión que esté conjugado a un marcador que pueda ser detectado a través de métodos no invasivos. El conjugado de anticuerpo-marcador del ligando de unión -marcador se deja suficiente tiempo para localizar y unir las células que expresan aminofosfolípidos y/o fosfolípidos aniónicos en el sitio de enfermedad, tal como en el tumor o vasculatura del tumor. El paciente es expuesto después a un dispositivo de detección para identificar el marcador detectable, formando así una imagen del sitio enfermo o tumor.

Los isótopos de resonancia de espín magnético nuclear, tales como el gadolinio, son detectados usando un dispositivo para formación de imágenes magnética nuclear; y substancias radioactivas tales como el tecnecio^{99m} o indio^{111}, son detectados usando un detector o cámara de escintilación gamma. La patente US No 5,627,036 proporciona una guía adicional con respecto a la seguridad e introducción eficaz de construcciones marcadas de manera detectable, en la sangre de un individuo, y medios para determinar la distribución del agente marcado detectablemente, extracorpóreamente, por ejemplo usando una cámara de escintilación gamma o a través de la medición de la resonancia magnética.

Las dosificaciones para realizaciones de formación de imágenes, son generalmente menores que para la terapia, pero son dependientes también de la edad y peso de un paciente. Como útil se contempla una sola dosis de entre aproximadamente 0,1, 0,5 o aproximadamente 1 mg y aproximadamente 9 o10 mg, y más preferentemente, de entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 5-10 mg del conjugado de anticuerpo o ligando de unión, por paciente.

L3. Marcador Sustitutivo para Terapia del Cáncer

Con respecto a la formación de imágenes y diagnóstico *in vivo*, la invención proporciona además composiciones y métodos para su uso como un marcador sustitutivo para la terapia del cáncer. Esas realizaciones se refieren al uso de

un anticuerpo que se une a un aminofosfolípido y/o a un fosfolípido aniónico, preferentemente FS, y más preferentemente al uso de anticuerpos 9D2 o 3G4 (ATCC 4545) o anticuerpos competidores, unidos a un agente detectable *in vivo*.

Muchas terapias contra el cáncer, actualmente en uso, inducen a la apoptosis y a la necrosis. Los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, particularmente la FS, son marcadores de células preapoptóticas y apoptóticas. Por lo tanto, la formación de imágenes con un anticuerpo apropiado, preferentemente con los anticuerpos 9D2 o 3G4 (ATCC 4545) o anticuerpos competidores, puede usarse para identificar células preapoptóticas y apoptóticas y proporcionar de esta manera información con respecto al progreso de la terapia. Esto es lo que se entiende como un "marcador sustitutivo para la terapia del cáncer" tal como se usa en la presente memoria.
El uso de los anticuerpos de la invención, preferentemente aquellos que comprenden los anticuerpos 9D2 o 3G4 (ATCC 4545) o anticuerpos competidores con propiedades similares, proporciona ventajas particulares como un marcador sustitutivo para terapia del cáncer. Por ejemplo, la capacidad de identificar células preapoptóticas, es una ventaja particular. La especificidad de los anticuerpos proporcionará también datos de formación de imágenes más significativos para el médico. También, el perfil de seguridad de estos anticuerpos es impresionante y proporciona ventajas con respecto a la anexina, por ejemplo, ya que la anexina tiene las desventajas asociadas con la coagulación.

Por consiguiente, cualquiera de los métodos de diagnóstico y de formación de imágenes *in vivo* descrito anteriormente puede adaptarse para su uso en el pronóstico, como un marcador sustitutivo para la terapia del cáncer, simplemente mediante el uso en un paciente sometido a terapia contra el cáncer.

M. Tratamiento de Tumores

Aspectos importantes de la invención se refieren al tratamiento de malignidades, tumores y tumores vascularizados. Estos incluyen tumores en los que la angiogénesis es más o menos importante y los tumores tienen vasos sanguíneos protrombóticos. El tratamiento de los tumores benignos se incluye en la invención, tales como el neuroma acústico, neurofibroma, tracoma, granulomas piogénicos y BPH. También se incluye el tratamiento de tumores de nacimiento en la sangre, tales como leucemias, y diversas enfermedades neoplásicas agudas o crónicas de la médula ósea.

La presente invención es ampliamente aplicable al tratamiento de cualquier tumor maligno, ya sea que tenga o no un componente vascular. Los tumores para el tratamiento incluyen tumores sólidos, particularmente carcinomas, que requieren de un componente vascular para el suministro de oxígeno y nutrientes. Tumores sólidos ejemplares que pueden tratarse usando la invención incluyen, sin limitación, los carcinomas de pulmón, de mama, de ovarios, de estómago, de páncreas, de laringe, de esófago, de testículos, de hígado, de parótidas, del tracto biliar, de colon, del recto, del cuello uterino, del útero, del endometrio, de riñón, de vejiga, de próstata, de tiroides, carcinomas de las células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de células pequeñas, melanomas, gliomas, glioblastomas, neuroblastomas, y similares.

La presente invención se contempla para el uso en el tratamiento de cualquier paciente que presente un tumor sólido. En general la invención puede usarse para tratar tumores de todos los tamaños, incluyendo aquellos de 0,3-0,5 cm y mayores, tumores mayores de 0,5 cm y pacientes que presenten tumores de entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 cm, aunque también se pueden tratar tumores mayores y que incluyan los tumores más grandes encontrados en los seres humanos.

Aunque la presente invención no pretende generalmente servir como un tratamiento preventivo o profiláctico, el uso de la invención no se encuentra ciertamente limitado al tratamiento de pacientes que tengan tumores con tamaños grandes o únicamente moderados. Existen muchas razones que respaldan estos aspectos de la invención. Por ejemplo, un paciente que presente un tumor primario de tamaño moderado o mayor puede tener también otros diversos tumores metastásicos que sean considerados de tamaño pequeño o incluso en etapas más tempranas de la siembra del tumor metastásico. Dado que los anticuerpos antiaminofosfolípidos o antifosfolípidos aniónicos o derivados de péptidos de unión a la FE, o combinaciones, de la invención, son administrados generalmente a la circulación sistémica de un paciente, tendrán naturalmente efectos en tumores secundarios, más pequeños y metastásicos, aunque esto puede no ser el propósito principal del tratamiento. Además, incluso en situaciones en donde la masa del tumor como un todo sea un solo tumor pequeño, ciertos efectos antitumorales beneficiosos resultarán del uso de los tratamientos de la presente invención

La guía proporcionada en la presente memoria con respecto a los pacientes más convenientes para su uso con la presente invención se pretende como enseñanza de que ciertos perfiles de pacientes pueden ayudar en la selección de pacientes para el tratamiento de la presente invención La preselección de ciertos pacientes, o categoría de pacientes, de ninguna manera niegan la utilidad básica de la presente invención en relación con el tratamiento de todos los pacientes que tengan cáncer. Una consideración adicional es el hecho de que el ataque sobre el tumor proporcionado por la terapia con anticuerpos de la invención puede predisponer al tumor a otro tratamiento terapéutico, de manera que el tratamiento posterior da como resultado un efecto sinérgico global o aún conduce a la remisión o cura total.

No se cree que ningún tipo particular del tumor deberá excluirse del tratamiento usando la presente invención. Sin embargo, el tipo de células de tumor puede ser relevante para el uso de la invención en combinación con otras sustancias terapéuticas terciarias, particularmente quimioterapéuticos y las inmunotoxinas celulares antitumorales. Como la presente invención incluye dentro de sus modos de acción de la localización dirigida y destrucción de la vasculatura del tumor, y como la vasculatura es sustancialmente o enteramente la misma en todos los tumores sólidos, se entenderá que la presente metodología es ampliamente o enteramente aplicable al tratamiento de todos los tumores sólidos, independientemente del genotipo particular o genotipo de las mismas células del tumor. Los datos presentados en la presente memoria son de suma importancia ya que muestran impresionantes resultados en una amplia variedad de diferentes modelos de tumores.

Las dosis terapéuticamente eficaces se pueden determinar fácilmente usando datos de un modelo animal, como se muestra en los estudios detallados en la presente memoria y a partir de datos clínicos que usen una variedad de agentes terapéuticos. Los animales experimentales que tienen tumores sólidos frecuentemente se usan para optimizar las dosis terapéuticas adecuadas antes de trasladarlas a un ambiente clínico. Estos modelos se sabe que son muy confiables para predecir estrategias anticáncer eficaces. Por ejemplo, los tumores sólidos que tiene los ratones, tales como los usados en los ejemplos, se usan ampliamente en pruebas preclínicas. Los inventores han usado estos modelos de ratón aceptados en la técnica para determinar intervalos de trabajo de los agentes terapéuticos que producen efectos antitumorales beneficiosos con toxicidad mínima.

En términos de la terapia de tumores, teniendo en cuenta los beneficios de seguridad concurrentes, asociados con la invención global, se puede hacer referencia a la bibliografía científica y de patentes sobre el éxito del uso de otras terapias antivasculares. A manera de ejemplo, las Patentes US Nos 5,855, 866; 5,877,289; 5,965,132; 6,051,230; 6,004,555; 5,776,427, 6, 004,554; 6,036,955; y 6,093,399 describen adicionalmente el uso de esos agentes como pueden ser aplicados a los de la presente invención. Las patentes US Nos 6,312,694 y 6,406,693 proporcionan una guía de la dosificación y tratamiento usando anticuerpos no conjugados a la FS y FE e inmunoconjugados relacionados.

Como se sabe en la técnica, estos son objetivos realistas que se pueden usar como lineamentos en relación con las pruebas preclínicas antes de proceder al tratamiento clínico. Sin embargo, debido a la seguridad ya demostrada en los modelos aceptados, las pruebas preclínicas de la presente invención serán cuestión de optimización, en vez que de confirmar su efectividad. De este modo las prueba preclínicas se pueden emplear para seleccionar los agentes, dosis o combinaciones más ventajosas.

Cualquier dosis de anticuerpo, método combinado o medicamento que de por resultado algún efecto antitumoral regularmente detectable, incluyendo regresión de la vasculatura del tumor, detectable, trombosis y/o destrucción y necrosis del tumor, se definirá además como una invención útil. Los efectos regresivos, trombóticos, destructivos y necróticos deberán ser observados preferentemente entre aproximadamente 10% y aproximadamente 40-50% de los vasos sanguíneos del tumor y de los tejidos del tumor, hasta valores de aproximadamente 50% y aproximadamente 99% de esos efectos observados. La invención puede ser eficaz también contra vasos que se encuentren aguas abajo del tumor, es decir como objetivo al menos un subconjunto de los vasos drenadores, particularmente como citocinas liberadas del tumor las cuales actuarán en estos vasos, cambiando su perfil antigénico.

Se entenderá también que aún en las circunstancias en donde los efectos antitumorales de la terapia se encaminen al extremo bajo de este intervalo, dosis de anticuerpo anti-VEGF, que bloquea al VEGFR2, o anticuerpo o inmunoconjugado basado en 2C3, o terapia, puede ser que esta terapia todavía sea igual o aún más eficaz que otras terapias conocidas en el contexto de los objetivos del tumor o paciente particular. Desafortunadamente es evidente para un clínico que ciertos tumores y padecimientos no se pueden tratar eficazmente en el plazo intermedio o largo plazo, pero no se niega la utilidad de la presente terapia, particularmente cuando es cuando menos tan eficaz como las otras estrategias generalmente propuestas.

Para diseñar dosis adecuadas de anticuerpos antiaminofosfolípido y antifosfolípido aniónico, los derivados de péptidos de unión a la FE o productos terapéuticos combinados para el tratamiento de tumores vascularizados, se puede fácilmente extrapolar de estudios en animales descritos en la presente memoria con el fin de llegar a dosis adecuadas para la administración clínica. Para lograr esta conversión, se tomará en cuenta la masa de los agentes administrados por masa unitaria del animal experimental y, preferiblemente, se tomaría en cuenta las diferencias en el área superficial del cuerpo entre el animal experimental y el paciente humano. Todos estos cálculos son muy conocidos y de rutina para los expertos en la técnica.

Por ejemplo, para tomar una dosis exitosa de productos terapéuticos usados en los estudios de ratones, y aplicar cálculos estándares basados en la masa y área superficial, las dosis eficaces de agentes para su uso en pacientes humanos varían entre aproximadamente 1 miligramo y aproximadamente 500 miligramos de anticuerpo por paciente, o preferiblemente, entre aproximadamente 10 miligramos y aproximadamente 100 miligramos de anticuerpo por paciente.

Por consiguiente, usando esta información los inventores contemplan que dosis bajas útiles para la administración a humanos estarán entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25 o aproximadamente 30 mg o valor parecido por

paciente; y las dosis útiles altas para la administración humana serán de aproximadamente 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o aproximadamente 500 mg o valor parecido por paciente. Las dosis intermedias útiles para la administración humana se contemplan que sean de aproximadamente 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 o aproximadamente 225 mg o valor similar por paciente. En general, se preferirán los intervalos de dosis de entre aproximadamente 5-100 mg, aproximadamente 10-80 mg, aproximadamente 20-70 mg, aproximadamente 25-60 mg o aproximadamente 30-50 mg por paciente. Sin embargo se contempla cualquier intervalo particular que use cualquiera de las dosis ejemplares mencionadas anteriormente, o cualquier valor intermedio entre los intervalos mencionados, particulares.

No importando los intervalos mencionados, se comprenderá que, dados los parámetros y la guía detallada presentada en la presente memoria, variaciones adicionales en los intervalos activos u óptimos se encontrarán comprendidos dentro de la invención. Por lo tanto se entenderá que dosis menores pueden ser más adecuadas en combinación con ciertos agentes, y que las dosis altas todavía pueden ser toleradas, particularmente dada la seguridad mejorada de las construcciones de la presente invención. El uso de anticuerpos humanos o humanizados y efectores humanos vuelve a la presente invención aún más segura para uso clínico, reduciendo además las oportunidades de toxicidad o efectos secundarios en tejidos sanos.

La intención de los regímenes terapéuticos de la presente invención generalmente es producir efectos antitumorales significativos al mismo tiempo que todavía se mantienen las dosis por debajo de los niveles asociados con toxicidad inaceptable. Además de variar la dosis misma, el régimen de administración también se puede adaptar para optimizar la estrategia del tratamiento. Una estrategia de tratamiento actualmente preferida es administrar entre aproximadamente 1 y 500 mg, y preferentemente entre aproximadamente 10 y 100 mg del anticuerpo, o cóctel terapéutico que contenga el mismo, aproximadamente 3 veces dentro de un período de aproximadamente 7 días. Por ejemplo, las dosis serán administradas alrededor del día 1, día 3o4 y el día 6o7.

Para administrar las mismas dosis particulares, se preferiría proporcionar una composición farmacéuticamente aceptable (de acuerdo con los estándares de la FDA de esterilidad, pirogenicidad, pureza y seguridad general) al paciente sistémicamente. La inyección intravenosa se prefiere generalmente, y el método más preferido es emplear una infusión continua durante un período de tiempo de aproximadamente 1 o 2 horas más o menos. Aunque no se requiere determinar esos parámetros antes del tratamiento usando la invención, se observará que los estudios detallados en la presente memoria dan por resultado que se observe al menos cierta trombosis en los vasos sanguíneos de un tumor sólido dentro de aproximadamente 12-24 horas de la inyección, y que las células tumorales mismas empiecen a morir dentro de aproximadamente 24 a 72 horas. La necrosis generalizada del tumor se observa generalmente en el próximo período de 48 a 96 horas, incluyendo una necrosis observada mayor que el 60%.

Naturalmente, antes del uso de difusión amplia, se llevarán a cabo ensayos clínicos. Los distintos elementos para llevar a cabo un ensayo clínico, incluyendo el tratamiento del paciente y supervisión, serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la descripción presente. La siguiente información se presenta como un lineamento general para su uso para establecer estos ensayos.

Los pacientes elegidos para los primeros estudios de tratamiento no respondieron a cuando menos un curso de terapia convencional, y tendrán enfermedad objetivamente medible como se determina por examen físico, técnicas de laboratorio, y/o procedimiento radiográficos. Cualquier quimioterapia deberá detenerse cuando menos dos semanas antes de entrar en el estudio. Cuando se emplean porciones de anticuerpo o anticuerpos monoclonales de murinos, los pacientes deberán no tener historia de alergia a la inmunoglobulina de ratón.

Se encontrarán varias ventajas en el uso de catéter venoso central interno con un puerto de lumen triple. Los compuestos terapéuticos deberán filtrarse, por ejemplo usando un filtro de 0.22 µ, y diluirse adecuadamente, tal como mediante salina, hasta un volumen final de 100 mililitros. Antes del uso, la muestra de prueba deberá también filtrarse de manera similar, y su concentración valorarse antes y después de la filtración determinando el $A_{28}O$. La recuperación esperada deberá estar dentro del intervalo de 87% a 99% y se pueden determinar los ajustes por pérdida de proteína.

Las construcciones se pueden administrar durante un período de aproximadamente 4-24 horas, recibiendo cada paciente 2-4 infusiones a intervalos de 2-7 días. La administración también se puede realizar mediante una velocidad estable de infusión durante un período de 7 días. La infusión dada a cualquier nivel de dosis deberá ser dependiente de cualquier toxicidad observada. Por lo tanto si se alcanza la toxicidad de grado II después de una sola infusión, en un período particular de tiempo para una infusión de velocidad estable, otras dosis deberán detenerse o parar la infusión de velocidad estable a menos que mejore la toxicidad. Dosis crecientes deberán administrarse a grupos de pacientes hasta que aproximadamente el 60 por ciento de los pacientes muestren toxicidad grado III o IV inaceptable en cualquier categoría. Las dosis que sean 2/3 de este valor se definen como dosis seguras.

El examen físico, las mediciones del tumor, y las pruebas de laboratorio, deberán, desde luego, realizarse antes del tratamiento y a intervalos hasta de un mes después. Las pruebas de laboratorio deberán incluir recuentos sanguíneos completos, creatinina de suero, creatinina quinasa, electrólitos, urea, nitrógeno, SGOT, bilirrubina, albúmina y proteína de suero total. Las muestras de suero tomadas hasta 60 días después del tratamiento deberán evaluarse mediante radioinmunoensayo para detectar la presencia de la construcción y anticuerpos contra cualquier porción de las

mismas. Los análisis inmunológicos del suero, usando cualquier ensayo estándar tal como por ejemplo, un ELISA o RIA permitirá evaluar la farmacocinética y la eliminación del compuesto terapéutico a ser evaluado.

Para evaluar las respuestas antitumorales, los pacientes deberán ser examinados de 48 horas a 1 semana y después a 30 días después de la última infusión. Cuando esté presente una enfermedad manifiesta, deberán medirse diariamente dos diámetros perpendiculares de todas las masas del tratamiento dentro de una semana después de completar la terapia, y a los 30 días. Para medir enfermedad no manifiesta, escaneos de tomografía computarizada en serie podrían realizarse a intervalos de 1 centímetro en todo el pecho, abdomen, y pelvis en las 48 horas y hasta 1 semana y de nuevo a los 30 días. Las muestras de tejido deberán también ser evaluadas histológicamente, y/o mediante citometría de flujo, usando biopsias de los sitios de la enfermedad o hasta de muestras de sangre o de fluido si es lo adecuado.

Las respuestas clínicas se pueden definir mediante medición aceptable. Por ejemplo, una respuesta completa se puede definir por la desaparición de todo tumor medible 1 mes después del tratamiento. Mientras que una respuesta parcial se puede definir por una reducción al 50 por ciento o mayor de la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todos los nódulos de tumor evaluables 1 mes después del tratamiento, sin sitios de tumor mostrando agrandamiento. De manera similar, se puede definir una respuesta mezclada mediante una reducción del producto de diámetros perpendiculares de todas las lesiones medibles por 50 por ciento o más 1 mes después del tratamiento, con avance en uno o más sitios.

A la luz de los resultados de ensayos clínicos, tales como los descritos anteriormente, se puede formular aún un régimen de tratamiento más preciso. Aún así, alguna variación en la dosis puede ser posteriormente necesaria dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. El médico responsable de la administración podrá, a la luz de la descripción, determinar la dosis adecuada para el sujeto individual. Esta optimización y ajuste se lleva a cabo de manera rutinaria en la técnica y de ninguna manera refleja una cantidad inapropiada de experimentación.

N. Terapias de Combinación contra Tumores

Los métodos de tratamiento de la invención pueden ser combinados con cualquiera otros métodos empleados generalmente en el tratamiento de los tumores particulares, enfermedad o trastorno que exhiba el paciente, siempre y cuando no se conoce que un enfoque terapéutico particular es dañino para la misma afección del paciente, y que no contrarreste significativamente el tratamiento a base de antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, de la invención, se contempla su combinación con la presente invención.

La terapia de combinación para enfermedades no malignas también se contempla. Un ejemplo particular de las mismas es la hiperplasia prostática benigna (BPH), la cual puede ser tratada en combinación con otros tratamientos llevados a la práctica actualmente en la técnica. Por ejemplo, la localización dirigida de inmunotoxina a marcadores localizados en la BPH, tal como la PSA.

Con relación al tratamiento de tumores sólidos, la invención puede ser usada en combinación con enfoques clásicos, tales como cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia con citocinas, antiangiogénesis y similares. La invención proporciona entonces terapias combinadas en las cuales, los anticuerpos, inmunoconjugados o conjugados de péptidos se usan simultáneamente con, antes, o después de la cirugía o el tratamiento con radiación; o se administran a pacientes con, antes, o después de agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos convencionales, citocinas, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis, inmunotoxinas objetivas o coaguligandos o similares. Muchos ejemplos de agentes terapéuticos apropiados han sido descritos con relación a los aspectos de inmunoconjugados de la invención. Cualquiera de los agentes descritos inicialmente para uso como una parte de un conjugado terapéutico o puede ser usado por separado, en las terapias de combinación de la invención.

En términos de cirugía, cualquier intervención quirúrgica puede ser llevada a la práctica en combinación con la invención. Con relación a la radioterapia, cualquier mecanismo para inducir daño al ADN localmente dentro de las células tumorales es contemplado, tal como la irradiación γ, los rayos X, la irradiación de UV, microondas e inclusive emisiones electrónicas y similares. El suministro dirigido de radioisótopos a células tumorales también es contemplado y puede usarse con relación a un anticuerpo de localización dirigida o a otros medios para localización dirigida.

El uso general de combinaciones de substancias en el tratamiento del cáncer es bien conocido. Por ejemplo, la patente US No 5,710,134 describe componentes que inducen necrosis en tumores en combinación con substancias no tóxicas o "profármacos". Las enzimas dejadas libres por los procesos necróticos escinden el "profármaco" no tóxico para producir el "fármaco" tóxico, lo cual conduce a la muerte de la célula tumoral. También, la patente US No 5,747,469 describe el uso combinado de vectores virales que codifican el p53 y agentes que dañan el ADN. Se puede usar cualquiera de esos enfoques similares con la presente invención.

Cuando se usan uno o más agentes en combinación con los anticuerpos, inmunoconjugados y productos terapéuticos a base de péptidos, de la invención, no hay requisito para que los resultados combinados sean aditivos de los efectos observados cuando cada tratamiento se lleve a cabo por separado. Aunque al menos se desean generalmente efectos aditivos, cualquier efecto antitumoral incrementado, por encima de las terapias individuales, sería beneficioso.

También, no existe requisito particular para que el tratamiento combinado exhiba efectos sinérgicos, aunque esto es ciertamente posible y ventajoso.

N1. Selección de Segundos Agentes Anticancerosos

Los "agentes terapéuticos primarios" de la invención, tal como se usan en la presente memoria, son anticuerpos antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, inmunoconjugados o derivados y conjugados de péptidos de unión a la FE. Los "agentes terapéuticos secundarios", tal como se usan en la presente memoria, son segundos agentes terapéuticos distintos, o agentes anticancerosos, es decir agentes terapéuticos o agentes anticancerosos "diferentes al" agente terapéutico primario se puede usar cualquier agente terapéutico secundario en las terapias de combinación de la presente invención. También, los agentes terapéuticos secundarios o "segundos agentes anticancerosos" pueden ser seleccionados con la intención de conseguir un efecto aditivo, más que aditivo y efectos potencialmente sinérgicos, de acuerdo con la siguiente guía.

Para llevar a cabo la terapia antitumoral combinada, simplemente se administraría a un animal o paciente un anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, inmunoconjugado o producto terapéutico a base de péptido de unión a la FE, de la presente invención, en combinación con otro, es decir un segundo agente anticanceroso, distinto, en una manera eficaz para que produzca sus acciones antitumorales combinadas en el animal o paciente. Los agentes serían proporcionados entonces en cantidades eficaces y durante períodos de tiempo eficaces para que den por resultado su presencia combinada en el tumor o vasculatura del tumor y sus acciones combinadas en el ambiente del tumor. Para conseguir este objetivo, los compuestos terapéuticos primarios de la presente invención y los segundos agentes anticancerosos, distintos, pueden ser administrados a un animal en forma sustancialmente simultánea, ya sea en una sola composición o como dos composiciones distintas usando diferentes vías de administración.

Alternativamente, el anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, inmunoconjugado o producto terapéutico en base de péptido de unión a la PE, de la presente invención, puede preceder, o seguir, al segundo agente anticanceroso distinto, por ejemplo, intervalos que varíen desde minutos hasta semanas. En ciertas realizaciones en donde los compuestos terapéuticos de la invención y los segundos agentes anticancerosos, distintos, se apliquen por separado al animal, se aseguraría que un período significativo no haya transcurrido entre el tiempo de cada administración, de manera tal que cada agente pueda aún ejercer un efecto combinado ventajoso sobre el tumor. En esos casos se contemplan que se pondría en contacto el tumor con ambos agentes, dentro de aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente una semana de cada otro y, más preferentemente, desde aproximadamente 12 a 72 horas uno del otro, con un tiempo de retardo de sólo aproximadamente 12 a 48 horas, siendo este último el más preferido.

Los agentes terapéuticos secundarios para terapias de combinación sincronizadas, en forma separada pueden ser seleccionados en base a ciertos criterios, incluyendo aquellos analizados posteriormente. Sin embargo, una preferencia a seleccionar uno o más segundos agentes anticancerosos, distintos, antes o después de la administración no evita su uso en la administración sustancialmente simultánea si así se desea.

En segundo lugar, los agentes anticancerosos distintos seleccionados para la administración "antes de" los agentes terapéuticos primarios de la invención, y diseñados para conseguir efectos incrementados y potencialmente sinergicos, incluyen agentes que inducen la expresión de aminofosfolípidos o fosfolípidos aniónicos en la vasculatura del tumor. Por ejemplo, los agentes que estimulan la producción localizada del calcio, activan los transportadores en la membrana que mueven la FS y otros fosfolípidos a la superficie exterior de la membrana plasmática, dañan el endotelio del tumor, causan cambios preapoptóticos y/o inducen apoptosis en el endotelio del tumor, darán por resultado generalmente una expresión incrementada del aminofosfolípido y fosfolípido aniónico. Ejemplos de esos agentes son el docetaxel y paclitaxel. Los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos pueden ser dirigidos usando un anticuerpo de la invención, amplificando entonces el efecto terapéutico global, y proporcionando también un ataque incrementado a través de efectores huésped (complemento) ADCC, fagocitosis mediada por el anticuerpo, CDC).

Los fármacos que tienen selectividad por células angiogénicas, remodeladoras o endoteliales activadas, tales como las que se encuentran presentes en vasos sanguíneos de tumores, pero no en vasos sanguíneos en reposo, normales, pueden usarse también para causar selectivamente la exposición de la FS y otros fosfolípidos sobre la superficie de las células endoteliales de tumores. Son ejemplos de esos agentes las combretastatinas y el docetaxel. Esto conduciría nuevamente a una unión incrementada del anticuerpo y a un inicio mejorado de los mecanismos efectores del huésped.

En segundo lugar los distintos agentes anticancerosos seleccionados para la administración "posterior" a los agentes terapéuticos primarios de la presente invención, y diseñados para conseguir efectos incrementados y potencialmente sinérgicos incluyen agentes que se benefician de los efectos del agente terapéutico primario. El anticuerpo antiaminofosfolípido o antifosfolípido aniónico, inmunoconjugado o compuesto terapéutico a base de péptido, de la presente invención, causara la destrucción del tumor. Por consiguiente, los segundos agentes anticancerosos, distintos, eficaces , para la administración posterior, incluyen agentes antiangiogénicos que inhiben la metástasis; agentes para la localización dirigida de células tumorales necróticas, tales como anticuerpos específicos para antígenos intracelulares que se vuelvan accesibles a la células malignas *in vivo* (patentes US Nos 5,019,368,

4,861,584 y 5,882,626), y agentes quimioterapéuticos e inmunoconjugados de células antitumorales, que atacan cualquiera células antitumorales que puedan sobrevivir en la periferia.

En algunas situaciones puede ser deseable prolongar el tiempo de tratamiento significativamente, en donde transcurran varios días (2, 3, 4, 5, 6,o 7), varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) o incluso varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas esto sería ventajoso en circunstancias en donde se pretenda un tratamiento para destruir sustancialmente el tumor, tal como el agente terapéutico primario de la presente invención, y se pretenda otro tratamiento para prevenir la micrometástasis o nuevo crecimiento del tumor, tal como la administración de un agente antiangiogénico. Los agentes antiangiogénicos deberán ser administrados en un tiempo prudente después de la cirugía, y no obstante deben permitir la cicatrización eficaz de la herida. Los agentes antiangiogénicos pueden ser administrados entonces durante la vida del paciente.

También se contempla que se utilice más de una administración ya sea del agente terapéutico primario o del segundo agente anticanceroso distinto. El agente terapéutico primario y el segundo agente anticanceroso distinto pueden ser administrados en forma intercambiable, en días o semanas alternadas; o se puede proporcionar una secuencia de un tratamiento con un agente, seguido de una secuencia del otro tratamiento. En todo caso, para conseguir una regresión del tumor usando una terapia combinada, todo lo que se requiere es suministrar ambos agentes en una cantidad eficaz combinada para ejercer un efecto antitumoral, sin importar las veces de su administración.

Ya sea que se administre en forma sustancialmente simultánea o secuencial, los anticuerpos antiaminofosfolípido y antifosfolípido aniónico y los productos terapéuticos de la presente invención, pueden ser administrados en combinación con uno o más agentes o fármacos quimioterapéuticos, los fármacos quimioterapéuticos pueden exterminar las células tumorales proliferantes, mejorar las áreas necróticas creadas por el tratamiento global. Los fármacos pueden así mejorar la acción trombótica de los agentes terapéuticos primarios de la invención.

La mayoría de los fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer son selectivos para las células oxigenadas en división. Estos tienen ventajas en terapia combinada ya que el fármaco quimioterapéutico actúa en diferentes objetivos desde los agentes terapéuticos primarios de la invención, conduciendo a un efecto antivascular o antitumoral más completo. Por ejemplo, los fármacos quimioterapéuticos son selectivamente activos contra las células tumorales oxigenadas, de división rápida, en la periferia del tumor mientras que los agentes de la invención actúan principalmente en los vasos o células tumorales en el núcleo del tumor "dañado", en donde las especies oxígeno reactivo, activador, son abundantes. Los fármacos antiangiogénicos que son selectivos para los vasos angiogénicos bien oxigenados, en la periferia del tumor, serían eficaces también en combinación, ya que los agentes de la invención actúan en los vasos inactivos, relativamente hipóxicos, en el núcleo del tumor.

Induciendo la formación de trombos en los vasos del tumor, los agentes terapéuticos primarios de la presente invención pueden mejorar también la acción de los fármacos quimioterapéuticos reteniendo o atrapando los fármacos en el tumor. Los agentes quimioterapéuticos son así retenidos dentro del tumor, mientras que el resto del fármaco es eliminado del cuerpo. Las células tumorales son entonces expuestas a una mayor concentración del fármaco por un mayor período. El atrapamiento del fármaco en el tumor hace posible reducir la dosis del fármaco, haciendo que el tratamiento sea más seguro y más eficaz.

Fármacos adicionales para el uso combinado en la presente invención son aquellos que actúan en las células que son "sensibilizadas" al fármaco por acción del agente terapéutico primario, de manera tal que se necesiten dosis reducidas del segundo fármaco para conseguir su efecto antitumoral. Por ejemplo, esto podría ocurrir en donde un componente principal de la acción del segundo fármaco sea ejercido en los vasos del tumor y los anticuerpos o agentes de la invención sensibilicen las células al fármaco. Lo mismo es cierto en donde el agente terapéutico primario de la invención sensibilice las células del tumor a un segundo fármaco, ya sea individualmente o a través de la estimulación de la liberación de citocina.

Otros segundos agentes anticancerosos, apropiados, para la terapia de combinación son aquellos que aumentan la actividad de células efectoras huésped, por ejemplo, inhibiendo selectivamente la actividad de componentes inmunosupresores del sistema inmune. Esos agentes habilitan los agentes terapéuticos primarios, que estimulan el ataque por las células efectoras como parte de su mecanismo, a que funcionen en forma más agresiva. Un ejemplo de ese tipo de agente es el docetaxel.

Aunque una comprensión del(de los) mecanismo(s) de la acción, preciso(s), de los agentes terapéuticos primarios, no es necesario para llevar a la práctica el tratamiento de la invención, datos y deducciones concernientes a esos mecanismos pueden ser usados para seleccionar segundos agentes anticancerosos, particulares, para el uso combinado en la presente invención. La efectividad de la terapia de combinación seleccionada, a su vez, soporta los datos originales y mecanismos de acción propuestos, y conduce también a categorías preferidas de segundos agentes anticancerosos para llevar a la práctica la terapia de combinación.

Se prefieren los fármacos que inducen la apoptosis para el uso en las terapias de combinación. El docetaxel, por ejemplo induce la apoptosis y por lo tanto la exposición a la FS uniéndose a los microtúbulos y perturbando la mitosis celular (Hotchkiss *et al.*, 2002). El tratamiento de células endoteliales, que recubren los vasos sanguíneos del tumor, y

las células tumorales con docetaxel a concentraciones subclínicas, demuestra en la presente memoria inducir la expresión de FS en la superficie celular, lo cual es demostrado por el fuerte unión del anticuerpo 3G4 *in vitro*.

Los inventores de la presente invención han determinado también que los efectos antitumorales de los efectos de la invención incluyen el aumento, mediado por el dominio Fc de las funciones efectoras inmunes, lo cual se muestra por la fagocitosis incrementada, mediada por anticuerpos. Por lo tanto, los anticuerpos deberán ejercer otras funciones mediadas por el dominio Fc, tales como ADCC, CDC, estimulación de la producción de citocinas, y esos mecanismos en combinación. Esto es relevante también para el docetaxel, ya que otros estudios han demostrado que el tratamiento de pacientes con cáncer de mama, con docetaxel, conduce a incrementos en los niveles de citocinas IFN-γ, IL-2, IL- 6 y GM-CSF, en suero, aumentado las respuestas inmune antitumorales en estos pacientes, al aumentar la actividad de las células destructoras naturales (NK) y de las células destructoras activadas por la linfocina (LAK) (Tsavaris *et al.*, 2002).

Por lo tanto, los inventores razonaron que el docetaxel inducirá tanto la expresión de la FS como la unión del anticuerpo administrado, y aumentara también las actividades de los efectores inmunes, que median los efectos antitumorales. En base a las consideraciones anteriores, los inventores han demostrado que la combinación de los anticuerpos de la presente invención, ilustrados por el anticuerpo 3G4, con el docetaxel, fue significativamente superior a la del docetaxel o a la del 3G4 solo, en ratones que tenían xenoinjertos de cáncer de mama humano MDA-MB-435, ortotópicos (ejemplo XX).

Por consiguiente, el docetaxel y otros agentes quimioterapéuticos que inducen apoptosis son agentes preferidos para el uso en los tratamientos de combinación de la invención. Combinaciones de anticuerpos con aminofosfolípidos y/o fosfolípidos aniónicos con fármacos quimioterapéuticos que inducen apoptosis, tales como el docetaxel, deberán atacar sinérgicamente las células endoteliales de la vasculatura del tumor y los compartimientos de las células del tumor, conduciendo no sólo a una eficacia del tratamiento significativamente mejorada sino que también a una menor toxicidad. Estas combinaciones se contemplan para el uso en el tratamiento del cáncer de mama, particularmente la combinación de la quimioterapia metronómica usando docetaxel con un anticuerpo de la presente invención.

N2. Endotoxina

La endotoxina y los derivados de endotoxina, destoxificados, pueden ser usados en el tratamiento de combinación, preferentemente a dosis bajas (publicación PCT No WO 03/028840). Se encuentran disponibles varias endotoxinas destoxificadas, que se prefieren para el uso en animales y particularmente para el uso en seres humanos. Las endotoxinas destoxificadas y refinadas, y combinaciones de las mismas se describen en las patentes US Nos 4,866,034; 4,435,386; 4,505,899; 4,436, 727; 4,436,728; 4,505,900.

El lípido A monofosforilo (MPL) derivado no tóxico, es un ejemplo de una endotoxina destoxificada que puede ser usada en la presente invención. Se sabe que el MPL es seguro en seres humanos; ensayos clínicos usando MPL como un adyuvante han demostrado que 100 $\mu g/m^2$ son seguros para el uso en seres humanos, inclusive en una base por paciente.

N3. Citocinas

La terapia con citocinas ha demostrado ser un patrón eficaz para regímenes terapéuticos combinados. Se pueden emplear varias citocinas en los enfoques combinados de la presente invención. Ejemplos de citocinas incluyen IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TGF-β, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNFα, TNFβ LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-α, IFN-β, IFN-γ. Las citocinas se administran de acuerdo con regímenes estándares, consistentes con indicaciones clínicas tales como la afección del paciente y la toxicidad relativa de la citocina. También se pueden usar uteroglobinas para prevenir o inhibir la metástasis (patente US No 5,696,092).

N4. TNFα e Inductores de TNFα

El TNFα y los inductores de TNFα pueden ser usados también en combinación con la presente invención. El TNFα incrementa la permeabilidad vascular y por lo tanto es útil en facilitar la penetración de los agentes anticancerosos en el tumor. Aunque la localización del anticuerpo no es de manera alguna un problema cuando se dirige un aminofosfolípido y fosfolípidos aniónicos, como en la presente invención, el uso combinado del TNFα puede facilitar el acceso de otros compuestos quimioterapéuticos e inmunoconjugados al tumor, e incrementar inclusive la unión de los anticuerpos de la invención a células tumorales bastante distantes.

También pueden usarse niveles bajos de endotoxina, antagonistas de Rac1, tales como adenovirus atenuado o manipulado por ingeniería, DMXAA (y FAA), CM101 y talidomida. Los antagonistas de Rac1 pueden ser usados en el tratamiento combinado de la presente invención, ya que aproximadamente 5000 partículas de ADN por célula causan un incremento del TNF independientemente del CD14 (Sanlioglu *et al.*, 2001). El CM101, la talidomida y el DMXAA pueden ser usados también en combinación con la misma, en dosis estándares o reducidas.

N5. Sustancias Quimioterapéuticas

Sin importar el(los) mecanismo(s) fundamental(es), una variedad de sustancias quimioterapéuticas se pueden usar en los métodos de tratamiento combinado descrito en la presente memoria. Los agentes quimioterapéuticos contemplados para su uso combinado incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, taxol, vinblastina, etopósido (VP-16), adriamicina, 5-fluorouracilo (5FU), camptotecina, actinomicina-D, mitomicina, combretastatina(s), más particularmente docetaxel, (taxotero), cisplastino (CDDP), ciclofosfamida, doxorrubicina, metotrexato, paclitaxel y vincristina y derivados y profármacos de los mismos.

Como lo entenderán los expertos en la técnica, las dosis adecuadas de sustancias quimioterapéuticas generalmente estarán alrededor de las ya empleadas en terapias clínicas, en donde se administran las sustancias quimioterapéuticas solas o en combinación con otras sustancias quimioterapéuticas. Sin embargo, dosis menores son ahora posibles debido a las ventajas proporcionadas por la presente invención. A manera de ejemplo solamente, sustancias tales como cisplatino, y otros alquilantes de ADN se pueden usar. El cisplatino se ha usado ampliamente para tratar el cáncer, con dosis eficaces usadas en aplicaciones clínicas de 20 miligramos/m^2 durante 5 días cada tres semanas durante un total de tres cursos. El cisplatino no se absorbe por vía oral, y por lo tanto se debe administrar mediante inyección intravenosa, subcutánea, intratumoral o intraperitoneal.

Otras sustancias útiles incluyen compuestos que interfieren con la replicación del ADN, mitosis, segregación cromosomal y/o actividad de tubulina. Estos compuestos quimioterapéuticos incluyen adriamicina, también conocida como doxorrubicina, etopósido, verapamil, podofilotoxina(s), combrestatina(s) y similares. De uso muy amplio en el escenario clínico para el tratamiento de neoplasmas, estos compuestos se administran a través de inyecciones de bolo por vía intravenosa a dosis que varían de 25-75 miligramos/m^2 a intervalos de 21 días para la adriamicina, a 3550 miligramos/m^2 por vía intravenosa para etopósido o el doble de la dosis intravenosa por vía oral.

Los agentes que interrumpen la síntesis y la fidelidad de precursores de polinucleótidos también se pueden usar. Particularmente son útiles sustancias que han sufrido pruebas extensas y están fácilmente disponibles. Como tales, las sustancias como el 5-fluorouracilo (5-FU) se usan preferencialmente por tejido neoplásico, haciendo esta sustancia particularmente útil para dirigirse a células neoplásicas. Aunque algo tóxico, el 5-FU, es aplicable en una amplia variedad de vehículos, incluyendo tópicos, sin embargo, la administración intravenosa con dosis que varían de 3 a 15 miligramos/kg/día se usa comúnmente.

Los agentes quimioterapéuticos ejemplares que son útiles con relación a la terapia combinada se indican en la Tabla D. Cada uno de los agentes indicados en la presente memoria son ejemplares y de ninguna manera limitantes. El técnico experto puede consultar "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, capítulo 33, en particular las págs. 624-652. Cierta variación en la dosis probablemente se presentará dependiendo de la afección que se esté tratando. El médico responsable de la administración será capaz de determinar la dosis adecuada para el sujeto individual.

TABLA D

Agentes Quimioterapéuticos Útiles en Enfermedades Neoplásicas			
CLASE	TIPO DE AGENTE	NOMBRES NO COMERCIALES (OTROS NOMBRES)	ENFERMEDAD
Agentes Alquilantes	Mostazas de Nitrógeno	Mecloretamina (HN_2)	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin.
		Ciclofosfamida Ifosfamida	Leucemias linfocíticas agudas y crónicas, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, mama, ovario, pulmón, tumor de Wilms, cuello uterino, testículos, sarcomas de tejido blando.
		Melfalan (L-sarcolisina)	Mieloma múltiple, mama, ovario.
		Clorambucilo	Leucemia linfocítica crónica, macroglobulinemia primaria, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin.
	Etilenimenos y Metilmelaminas	Hexametilmelamina	Ovario
		Tiotepa	Vejiga, mama, ovario.
	Alquilsulfonatos	Busulfán	Leucemia granulocítica crónica.
	Nitrosoureas	Carmustina (BCNU)	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no de Hodgkin, tumores de cerebro primarios, mieloma múltiple, melanoma maligno
		Lomustina (CCNU)	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, tumores cerebrales primarios, pulmón microcítico
		Semustina (metilCCNU)	Tumores cerebrales primarios, estómago, colon
		Estreptozocina (estreptozotocina)	Insulinoma pancreático maligno, carcinoide maligno
	Triacinas	Dacarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazol carboxamida)	Melanoma maligno, enfermedad de Hodgkin, sarcomas de tejido blando
Antimetabolitos	Análogos de Ácido Fólico	Metotrexato (ametopterina)	Leucemia linfocítica aguda, coriocarcinoma, micosis fungoide, mama, cabeza y cuello, pulmón, sarcoma osteogénico
	Análogos de Pirimidina	Fluouracilo (5-fluoro-uracilo; 5-FU). Floxuridina (fluorodesoxiuridina; FUdR).	Mama, colon, estómago, páncreas, ovario, cabeza y cuello, vejiga urinaria, lesiones de piel premalignas (tópicas)
		Citarabina (arabinósido de citosina)	Leucemias linfocítica aguda y granulocítica aguda
	Análogos de purina e inhibidores relacionados	Mercaptopurina (6-mercaptopurina 6-MP)	Leucemias linfocítica aguda, granulocítica aguda y granulocítica crónica
		Tioguanina (6- tioguanina; TG)	Leucemias granulocítica aguda, linfocítica aguda y granulocítica crónica
		Pentostatina (2-desoxicoformicina)	Tricoleucemia, micosis fungoide, leucemia linfocítica crónica
		Vinblastina (VLB)	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, mama, testículos
	Alcaloides de la Vinca	Vincristina	Leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma, tumor de Wilms, rabdomiosarcoma, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, pulmón microcítico
	Epipodofilotoxinas	Etopósido Tertipósido	Testículos, pulmón microcítico y otros pulmones, mama, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, leucemia granulocítica aguda, sarcoma

Agentes Quimioterapéuticos Útiles en Enfermedades Neoplásicas			
CLASE	TIPO DE AGENTE	NOMBRES NO COMERCIALES (OTROS NOMBRES)	ENFERMEDAD
			de Kaposi
Productos Naturales	Antibióticos	Dactinomicina (actinomicina D)	Coriocarcinoma, tumor de Wilms, rabdomiosarcoma, testículos, sarcoma de Kaposi
		Daunorrubicina (daunomicina; rubidomicina)	Leucemias granulocítica aguda y linfocítica aguda
		Doxorrubicina	Sarcomas de tejido blando, osteogénico y otros sarcomas; enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, leucemias agudas, mama, genitourinario, tiroides, pulmón, estómago, neuroblastoma
		Bleomicina	Testículos, cabeza y cuello, piel, esófago, pulmón y vías genitourinarias; enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin
		Plicamicina (mitramicina)	Testículos, hipercalcemia maligna
		Mitomicina (mitomicina C)	Estómago, cuello uterino, colon, mama, páncreas, vejiga, cabeza y cuello
	Enzimas	L-Asparaginasa	Leucemia linfocítica aguda.
	Modificadores de Respuestas Biológicas	Interferon alfa	Tricoleucemia, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinoide, célula renal, ovario, vejiga, linfomas no Hodgkin, micosis fungoide, mieloma múltiple, leucemia granulocítica crónica
Agentes diversos	Complejos de coordinación de platino	Cisplatino (*cis*-DDP) Carboplatino	Testículos, ovario, vejiga, cabeza y cuello, pulmón, tiroides, cuello uterino, endometrio, neuroblastoma, sarcoma osteogénico
	Antracenodiona	Mitoxantrona	Leucemia granulocítica aguda, mama
	Urea sustituida	Hidroxiurea	Leucemia granulocítica crónica, policitemia vera, trombocitosis esencial, melanoma maligno
	Derivado de Metilhidrazina	Procarbazina (N-metilhidrazina, MIH)	Enfermedad de Hodgkin
	Adrenocortical	Mitotano(*o,p'*-DDD)	Corteza adrenal
	Supresor	Aminoglutetimida	Mama
Hormonas y Antagonistas	Adrenocorticosteroides	Prednisona (diversas otras preparaciones equivalentes disponibles)	Leucemias linfocíticas agudas y crónicas, linfomas no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, mama
	Progestinas	Caproato de hidroxiprogesterona Acetato de medroxiprogesterona, Acetato de megestrol	Endometrio, mama
	Estrógenos	Dietilestilbestrol	
		Etinilestradiol (otras preparaciones disponibles)	Mama, próstata
	Antiestrógeno	Tamoxifeno	Mama
	Andrógenos	Propionato de Testosterona Fluoximesterona (otras preparaciones disponibles)	Mama
	Antiandrógeno	Flutamida	Próstata
	Análogo de la Hormona Liberadora de	Leuprolide	Próstata

Agentes Quimioterapéuticos Útiles en Enfermedades Neoplásicas			
CLASE	TIPO DE AGENTE	NOMBRES NO COMERCIALES (OTROS NOMBRES)	ENFERMEDAD
	Gonadotropina		

N6. Anti-Angiogénicos

El término "angiogénesis" se refiere a la generación de nuevos vasos sanguíneos, generalmente en un tejido u órgano. En condiciones fisiológicas normales, los seres humanos o animales sufren la angiogénesis sólo en situaciones restringidas específicas. Por ejemplo, la angiogénesis se observa normalmente en la cicatrización de heridas, en el desarrollo fetal y embrionario y en la formación del cuerpo lúteo, del endometrio y de la placenta. No obstante, nueva evidencia muestra que la angiogénesis es importante en ciertas situaciones normales, tales como en el tejido adrenal, próstata y ovarios. Los agentes terapéuticos de la presente invención, en los que la anti-angiogénesis no es el único modo de acción, tienen entonces ventajas con respecto a las terapias antiangiogénicas prominentes, tal como el anticuerpo A4.6.1 (Brem, 1998; Baca *et al.*, 1997; Presta *et al.*, 1997), porque la angiogénesis deseable o "fisiológica" no será inhibida cuando se use la invención.

La angiogénesis no controlada (persistente y/o no regulada) está relacionada con varios estados de enfermedad, y ocurre durante el desarrollo y metástasis de los tumores. La angiogénesis tanto controlada como no controlada procede, según se cree, en una manera similar. Las células endoteliales y los pericitos, rodeados por una membrana basal, forman vasos sanguíneos capilares. La angiogénesis empieza con la erosión de la membrana basal por las enzimas, liberadas por células endoteliales y leucocitos. Las células endoteliales, que revisten el lumen de los vasos sanguíneos, sobresalen después a través de la membrana basal. Los estimulantes angiogénicos inducen las células endoteliales para que emigren a través de la membrana basal erosionada. Las células emigrantes forman un "brote" fuera del vaso sanguíneo relacionado, en donde las células endoteliales sufren mitosis y se proliferan. Los brotes endoteliales se juntan unos con otros para formar rizos capilares creando el vaso sanguíneo.

A pesar de la nueva evidencia de que la angiogénesis es requerida en algunos tejidos normales, las terapias antiangiogénicas son todavía importantes en el tratamiento de tumores y otras enfermedades. Las terapias antiangiogénicas sirven entonces para el uso en los tratamientos de combinación de la invención. La combinación de una dosis baja, relativamente frecuente, de un agente terapéutico de la invención, en combinación con un agente que inhiba la angiogénesis, es particularmente contemplada. Los agentes antiangiogénicos ejemplares que son útiles con relación a una terapia combinada se listan anteriormente (con relación a los inmunoconjugados). Cualquiera de uno o más de esos agentes, incluyendo los de la Tabla B, pueden ser usados en una terapia de combinación con la invención. Actualmente se prefieren la angiostatina, endostatina, vasculostatina, canstatina y maspina.

Muchos agentes anticancerosos, conocidos, tienen también un efecto antiangiogénico como parte de su mecanismo de acción. Estos agentes, ilustrados por los de Tabla E, son particularmente contemplados para el uso en aspectos de terapia de combinación de la presente invención (pueden ser conjugados también con un anticuerpo de la invención, como se describió anteriormente).

TABLA E

Agentes Anticancerosos con Actividad Antiangiogénica	
Clase o tipo de agente	Ejemplos
Alquilantes	Ciclofosfamida, edelfosina, estramustina, melfalán
Antimetabolitos	Fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, UFT, tegafur, uracilo, citarabina
Antibióticos antitumorales	Bleomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, mitoxantrona
Inhibidores de la Topoisomerasa	Camptotecina, irinotecán, etopósido, topotecán
Taxanos	Docetaxel, paclitaxel
Alcaloides de la Vinca	Vinblastina, vincristina
Diversos	Cisplatino, octreótido

Además, el anticuerpo LM609 contra la integrina $\alpha_v\beta_3$ induce también regresiones de tumores y puede ser usado en terapias de combinación. Los antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$, tales como el LM609, inducen apoptosis de las células endoteliales angiogénicas dejando sin afectación a los vasos sanguíneos inactivos. El LM609 u otros antagonistas $\alpha_v\beta_3$ pueden trabajar también inhibiendo la interacción del $\alpha_v\beta_3$ y MMP-2, una enzima proteolítica, las cuales se cree juegan un papel importante en la migración de las células endoteliales y fibroblastos.

La apoptosis del endotelio angiogénico por el LM609 puede tener un efecto en cascada en el resto de la red vascular. La inhibición de la red vascular del tumor, para que responda completamente a la señal del tumor a expandirse puede, en efecto, iniciar el colapso parcial o total de la red, dando por resultado la muerte de las células tumorales y la pérdida del volumen del tumor. Es posible que la endostatina y la angiostatina funcionen en una forma similar. El hecho de que

el LM609 no afecte los vasos inactivos, pero que pueda causar regresiones en el tumor, sugiere fuertemente que no todos los vasos sanguíneos en un tumor necesitan ser alcanzados por el tratamiento a fin de obtener un efecto antitumoral.

También se pueden emplear anticuerpos para la angiogenina, como se describe en la patente US Nº 5,520,914. Como el FGF se encuentra relacionado con la angiogénesis, también se pueden usar inhibidores del FGF. Ciertos ejemplos son los compuestos que tienen N-acetilglucosamina alternando en secuencia con el ácido urónico 2-O-sulfatado como sus principales unidades de repetición, incluyendo los glucosaminoglucanos, tales como el sulfato de arcarano. Esos compuestos se describen en la patente US No 6,028,061, incorporada específicamente en la presente memoria como referencia, y pueden ser usados en combinación con la misma.

N7. Inhibidores de VEGF

El VEGF es una citocina multifuncional que es inducida por hipoxia y mutaciones oncogénicas. El VEGF es un estimulante primario del desarrollo y mantenimiento de una red vascular en la embriogénesis. Sus funciones como un potente agente inductor de permeabilidad, un agente quimiotáctico de las células endoteliales, un factor de supervivencia endotelial, y un factor de proliferación de las células endoteliales. Su actividad se requiere para el desarrollo normal embrionario, como ruptura dirigida de uno o ambos alelos del VEGF da por resultado la muerte embrionaria.

El uso de uno o más métodos de inhibición del VEGF es un aspecto preferido de las terapias de combinación de la presente invención. El reconocimiento del VEGF como un estímulo primario de la angiogénesis en condiciones patológicas ha conducido a varios métodos para bloquear la actividad del VEGF. Cualquiera de los inhibidores del VEGF desarrollados puede ser empleado ahora ventajosamente con la presente. Por consiguiente, puede entonces usarse uno cualquiera o más de los siguientes anticuerpos anti-VEGF neutralizantes, construcciones de receptores solubles, estrategias antisentido, aptámeros de ARN e inhibidores de la tirosina quinasa, diseñados para interferir con la señalización del VEGF.

Los agentes apropiados incluyen los anticuerpos neutralizantes (Kim *et al.*, 1992; Presta *et al.*, 1997; Sioussat *et al.*, 1993; Kondo *et al.*, 1993; Asano *et al.*, 1995), las construcciones de receptores solubles (Kendall and Thomas, 1993; Aiello *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1998; Millauer *et al.*, 1996), los inhibidores de la tirosina quinasa (Siemeister *et al.*, 1998), las estrategias antisentido, a los aptámeros de ARN y las ribozimas contra el VEGF o receptores del VEGF (Saleh *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1996). También se pueden emplear variantes del VEGF con propiedades antagonistas, tal como se describe en la WO 98/16551.

El bloqueo de anticuerpos contra el VEGF será preferido en ciertas realizaciones, particularmente por simplicidad. Los anticuerpos monoclonales contra el VEGF han demostrado inhibir el crecimiento de xenoinjertos en tumores humanos y la formación de ascitis en ratones (Kim *et al.*, 1993; Mesiano *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998a; 1998b; Borgstrom *et al.*, 1996; 1998). El anticuerpo A4.6.1 es un anticuerpo VEGF de gran afinidad, capaz de bloquear la unión del VEGF tanto al VEGFR1 como al VEGFR2 (Kim *et al.*, 1992; Wiesmann et al, 1997; Muller et al, 1998; Keyt et al, 1996). El A4.6.1 ha sido recientemente humanizado por técnicas de presentación de fagos monovalente y se encuentra actualmente en ensayos clínicos de Fase I como un agente anticanceroso (Brem, 1998; Baca *et al.*, 1997; Presta *et al.*, 1997).

La mutagénesis de exploración de alanina y la cristalografía de rayos X del VEGF unido por el fragmento Fab del A4.6.1 mostraron que el epítope en el VEGF que se une al A4.6.1 se encuentra centrado alrededor de los aminoácidos 89-94. Estos datos estructurales demuestran que el A4.6.1 inhibe competitivamente el VEGF a partir de la unión al VEGFR2, pero inhibe al VEGF a partir de la unión al VEGFR1 más probablemente por impedimento estérico (Muller *et al.*, 1998; Keyt *et al.*, 1996).

El A4.6.1 puede ser usado en combinación con la presente invención. Sin embargo, un nuevo anticuerpo denominado 2C3 (4545) se prefiere actualmente, el cual bloquea selectivamente la interacción del VEGF únicamente con uno de los dos receptores VEGF. El 2C3 inhibe el crecimiento, mediado por el VEGF, de células endoteliales, tiene potente actividad antitumoral y bloquea selectivamente la interacción del VEGF con el VEGFR2 (KDR/Flk-1), pero no el VEGFR1 (FLT-1). A diferencia del A4.6.1, el 2C3 permite la inhibición específica de la angiogénesis inducida por el VEGFR2, sin la Inhibición simultánea de la quimiotaxis de macrófagos (mediada por el VEGFR1), y de esta manera se contempla como un compuesto terapéutico más seguro. Las patentes US Nos 6,342,219, 6,342,221, 6,416,758 y 6,416,758, describen en forma aún adicional el anticuerpo 2C3 y sus usos en la terapia antiangiogénica y en la inhibición del VEGF.

N8. Agentes Inductores de Apoptosis

Los agentes terapéuticos de la invención se combinan también preferentemente con métodos de tratamiento que inducen apoptosis en cualquiera de las células en el tumor, incluyendo células tumorales y endoteliales vasculares de tumores. Los agentes ejemplares que inducen apoptosis se encuentran listados anteriormente (con relación a los inmunoconjugados). Se puede usar cualquiera o más de esos agentes inductores de apoptosis, en las terapias de combinación de la invención, sin ser enlazados a un anticuerpo de la invención.

Muchos agentes anticancerosos conocidos tienen también un efecto inductor de apoptosis, como parte de su mecanismo de acción. Estos agentes, ilustrados por los de la Tabla F, se contemplan particularmente para el uso en los aspectos de la terapia de combinación de la presente invención (también pueden ser conjugados a un anticuerpo de la invención como se describió anteriormente).

TABLA F

Agentes Anticancerosos que Inducen Apoptosis	
Clase o Tipo de Agente	Ejemplos
Antimetabolitos	Citarabina, fludarabina, 5-fluoro-29-desoxiuridina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato
Agentes reticulantes de ADN	Clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, mostaza de nitrógeno
Agentes Intercalantes	Adriamicina (doxorubicina), mitixantrona
Venenos de Topoisomerasa II	Etopósido, tenipósido
Agentes Dirigidos al Microtúbulo	Colcemida, colchicina, docetaxel, vincristina
Inhibidores de Quinasa	Flavopiridol, estaurosporina, STI571 (CPG 57148B), UCN-01 (7-hidroxiestaurosporina)
Inhibidores de Farnesil transferasa	L-739749, L-744832
Hormonas	Glucocorticoides, Fenretinida
Agentes de Fragmentación del ADN	Bleomicina
Antagonistas de Hormonas	Tamoxifeno, finasterida, antagonistas de LHRH
Compuestos Biológicos	TNF-a, TRAIL, anti-CD20
Inhibidores de la Síntesis de Proteínas	L-asparaginasa, cicloheximida, puromicina, toxina de la difteria
Venenos de Topoisomerasa II	Camptotecina, topotecán

N9. Inmunotoxinas y Coaguligandos

La presente invención puede ser usada también en combinación con otras inmunotoxinas o coaguligandos en los que la porción objetivo es dirigida a un marcador de células tumorales, vasculatura tumoral o estroma tumoral. Cualquiera de los agentes objetivo descritos en la presente memoria para el uso en la localización dirigida de un péptido de unión a la FE, en una célula tumoral, vasculatura tumoral o estroma tumoral, pueden ser usados en éstas realizaciones. En las inmunotoxinas, los agentes unidos incluyen agentes anticelulares o citotóxicos, citocinas, agentes radioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis y fármacos antitubulinas. En los coaguligandos los agentes unidos son coagulantes. Las Patentes US Nos 5,855,866, 5,965,132, 6,261,535, 6,051,230, 6,451,312 (inmunotoxinas), 6,093,399, 6,004,555, 5,877,289, y 6,036,955 (coaguligandos) ilustran dichas construcciones.

N10. Terapia ADEPT y de Profármaco

Los anticuerpos de la presente invención, incluyendo el 9D2, 3G4 (ATCC 4545) y similares, se pueden usar en conjunto con profármacos, en donde el anticuerpo se asocia operativamente con un componente de activación de profármaco, tal como una enzima que activa un profármaco, que convierte un profármaco en la forma más activa después del contacto con el anticuerpo. Esta tecnología generalmente se denomina "ADEPT", y se describe, por ejemplo, en las publicaciones WO 95/13095; WO 97/26918, WO 97/24143, y en las Patentes US Nos 4,975,278 y 5,658,568.

El término "profármaco" como se usa en la presente memoria, se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia biológicamente o farmacéuticamente activa que ejerce efectos citotóxicos reducidos o de otro modo anticelulares en células diana, incluyendo células endoteliales vasculares de tumores, en comparación con el fármaco parental en el cual se basa. Preferiblemente, el profármaco o forma precursora ejerce efectos citotóxicos o anticelulares significativamente reducidos, o más preferiblemente, despreciables en comparación con la forma "original" o parental. Los "profármacos" son capaces de ser activados o convertirse para producir la forma del fármaco parental, más activa.

La capacidad técnica para hacer y usar profármacos existe dentro de la experiencia del técnico ordinario. Willman y colaboradores, (1986) y Stella y colaboradores, (1985) cada una incorporada específicamente en la presente memoria como referencia con el fin de complementar adicionalmente la descripción de enseñanzas que se refieren a cómo hacer y usar varios profármacos. Las construcciones de profármacos ejemplares que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato (Patente US No 4,975,278), profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos basados en péptidos (Patentes US Nos 5,660, 829; 5,587,161; 5,405,990; WO 97/07118),profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glucosilados (Patentes US Nos 5,561, 119, 5,646,298; 4,904,768; 5,041,424), profármacos que contienen β-lactama,

profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida (Patente US 4,975,278), profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, e incluso profármacos de 5-fluorocitosina (Patente US No 4,975,278) y de 5-fluorouridina y similares.

El tipo de agente terapéutico o fármaco citotóxico que se puede usar en forma de profármaco prácticamente no tiene límites. La mayoría de los agentes citotóxicos se preferirán para tal forma de administración, sobre, por ejemplo, la administración de coagulantes, que son menos preferidos para su uso como profármacos. Todo lo que es requerido en la formación del profármaco es diseñar el construcción de manera que el profármaco sea sustancialmente inactivo y el fármaco "liberado" o activado tenga actividad sustancial, o cuando menos suficiente, para el propósito pretendido.

Varios mejoramientos en los profármacos originales también se conocen y contemplan para su uso con la misma, como se describe en la WO 95/03830; la Patente EP 751,144 (antraciclinas); la WO 97/07097 (ciclopropilindoles); y WO 96/20169. Por ejemplo, en la Patente US No 5,621,002 se describen profármacos con Km reducida, que pueden usarse en el contexto de la invención. También se conoce la terapia de profármacos que se puede llevar a cabo intracelularmente, como se ilustra en WO 96/03151, y se puede practicar con la misma.

Para su uso en ADEPT, el agente que activa o que convierte el profármaco en el fármaco más activo se une operativamente a un anticuerpo de la invención. El anticuerpo localiza así al profármaco convirtiendo la capacidad dentro del sitio angiogénico o del tumor, de manera que el fármaco activo solamente se produce en esas regiones y no en la circulación o en los tejidos sanos.

Las enzimas que se pueden unir a los anticuerpos de la invención, para funcionar en activación profármaco incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina para su uso en combinación con profármacos que contienen fosfato (Patente US No 4,975,278); arilsulfatasa para su uso en combinación con profármacos que contienen sulfato (Patente US No 5, 270,196); peptidasas y proteasas, tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasa (Patentes US Nos 5,660,829; 5,587,161; 5,405,990) y catepsinas (incluyendo catepsina B y L), para su uso en combinación con profármacos basados en péptido; D-alanilcarboxipeptidasas para su uso en combinación con profármacos modificados con D-aminoácidos; enzimas que disocian carbohidrato tales como β-galactosidasa y neuraminidasa para su uso en combinación con profármacos glucosilados (Patentes US Nos 5,561,119; 5,646, 298); β-lactamasa para su uso en combinación con profármacos que contienen β-lactama; penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa (Patente US No 4,975,278) o penicilina G amidasa, para su uso en combinación con fármacos derivatizados en sus amino nitrógenos con grupos fenoxiacetamida o fenilacetamida; y citosina desaminasa (Patentes US Nos 5,338, 678; 5,545,548) para su uso en combinación con profármacos basados en 5-fluorocitosina (Patente US No 4,975,278).

Anticuerpos con actividad enzimática, conocida como anticuerpos catalíticos o "abzimas", también se pueden emplear para convertir profármacos en fármacos activos. Abzimas basadas en los anticuerpos de la invención, preferentemente los anticuerpos 9D2 y 3G4 y anticuerpos similares, forman así otro aspecto de la presente invención. La capacidad técnica para preparar abzimas también se encuentra en los expertos habituales en la técnica, como ilustran Massey y colaboradores, (1987), específicamente incorporada en la presente memoria como referencia con fines de complementar la enseñanza de la abzima. Los anticuerpos catalíticos capaces de catalizar la degradación de un profármaco en la posición carbamato, tal como un aril carbamato de mostaza de nitrógeno, se contemplan adicionalmente, como se describe en la patente EP 745,673.

O. Liposomas Recubiertos con Anticuerpos y Agentes Terapéuticos

Las formulaciones liposomales se usan a menudo en agentes terapéuticos y compuestos farmacéuticos. Sin embargo, la biodistribución de los liposomas en estudios iniciales significa que esas formulaciones no fueron ampliamente aplicables para el uso en humanos. La tecnología de liposomas "de furtividad o furtivos" y formulaciones fueron así desarrolladas, las cuales permiten que los liposomas circulen por más tiempo. Un agente preferido para el uso en los liposomas furtivos es el polietilenglicol (PEG), y los liposomas resultantes se denominan también liposomas PEGilados.

Los liposomas furtivos han sido propuestos para el uso en el suministro de agentes citotóxicos a tumores en pacientes con cáncer. Una variedad de fármacos ha sido incorporado en los liposomas furtivos, incluyendo el cisplatino (Rosenthal *et al.*, 2002), TNFα (Kim *et al.*, 2002), doxorubicina (Symon *et al.*, 1999) y adriamicina (Singh *et al.*, 1999). Sin embargo, recientes informes han indicado una eficacia baja inesperada de la doxorubicina liposomal furtiva y de la vinorelbina en el tratamiento del cáncer de mama metastásico (Rimassa *et al.*, 2003).

La presente invención proporciona formulaciones de liposomas furtivos, mejoradas, que superan varias de las desventajas en la técnica, en las que los liposomas furtivos son asociados funcionalmente o "recubiertos" con un anticuerpo que se une a un aminofosfolípido aniónico, preferentemente a FS o FE. El 9D2, 3G4 (ATCC 4545) y similares, anticuerpos competidores de la invención, se prefieren para esos usos, aunque cualquier anticuerpo o región de unión al antígeno, del mismo, que se enlace a un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico, puede ser usado. Un anticuerpo divalente o porción de anticuerpo no se requiere en estos aspectos de la invención.

Cualquier liposoma furtivo, puede formar la base de nuevas formulaciones liposomales, y preferentemente se empleará un liposoma PEGilado. Los liposomas furtivos se encuentran "recubiertos", es decir, se encuentran operativa o funcionalmente asociados con el anticuerpo que se une a un aminofosfolípido o fosfolípido aniónico. La asociación operativa o funcional se realiza de manera tal que el anticuerpo conserve la capacidad de unirse específicamente al aminofosfolípido o fosfolípido aniónico diana, preferentemente FS o FE, suministrando o dirigiendo con ello, el liposoma furtivo y cualquier contenido del mismo, a las células positivas a la FS y/o a la FE, tales como a las células de tumores y células endoteliales vasculares de tumores.

Los liposomas furtivos recubiertos con anticuerpos de la invención, pueden usarse individualmente. Sin embargo, en forma preferentemente, esos liposomas contendrán también uno o más segundos agentes terapéuticos, tales como agentes anticancerosos o quimioterapéuticos (el primer agente terapéutico es el anticuerpo mismo). Los segundos agentes terapéuticos se describen generalmente como dentro del "núcleo" del liposoma. Algunos o más de los segundos agentes anticancerosos o quimioterapéuticos, conocidos en la técnica y/o descritos en la presente memoria para la conjugación de anticuerpos, o para terapias de combinación, pueden ser usados en liposomas furtivos recubiertos con anticuerpos, de la invención. Por ejemplo, cualquier agente quimioterapéutico o radioterapéutico, citocina, agente antiangiogénico o agente inductor de apoptosis. Actualmente preferidos dentro de los agentes quimioterapéuticos se encuentran los fármacos antitubulina, el docetaxel y paclitaxel.

Además, los liposomas furtivos recubiertos con anticuerpos, de la invención, pueden encontrarse también cargados con uno o más fármacos antivirales para el uso en el tratamiento de enfermedades e infecciones virales. Al igual que con los agentes anticancerosos, algunos o más de los segundos fármacos antivirales conocidos en la técnica y/o descritos en la presente memoria para la conjugación de anticuerpos, o para terapias de combinación, pueden ser usados, en los liposomas furtivos recubiertos con anticuerpos, de la invención. El Cidofavir y el AZT son ejemplos actualmente preferidos.

P. Terapia Antivascular, Anti-Angiogénica y Otras Terapias

La presente invención puede ser usada también en el tratamiento de otras enfermedades en las que se encuentren involucradas la vasculatura aberrante incluyendo enfermedades y trastornos que tengan vasos sanguíneos protrombóticos. Aunque no es el único mecanismo terapéutico, los anticuerpos, inmunoconjugados y compuestos terapéuticos a base de péptidos de la invención, pueden ser usados, para el tratamiento de animales y pacientes con angiogénesis aberrante, tal como el de contribuir a una variedad de enfermedades y trastornos.

Ya sea que se base en la antiangiogénesis, vasculatura protrombótica u otros mecanismos antivasculares, la presente invención puede ser usada entonces para tratar enfermedades prevalecientes y/o clínicamente importantes fuera del campo del cáncer, incluyendo artritis, artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Grave, restenosis vascular, incluyendo restenosis después de angioplasia, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma y glaucoma neovascular. Otros objetivos para intervención incluyen angiofibroma, placas ateroscleróticas, neovascularización de injerto córneo, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, síndrome de Osler-Weber, fibroplasia retrolental de granuloma piogénico, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, otras enfermedades y desórdenes inflamatorios, y hasta endometriosis. Otras enfermedades y desórdenes que son tratables por la invención, y la base unificante de estos desórdenes angiogénicos, se presentan más adelante.

Una enfermedad prominente en la cual participa la vasculatura aberrante y la angiogénesis es la artritis reumatoide, en donde los vasos sanguíneos en el recubrimiento sinovial de las articulaciones sufren angiogénesis. Además de formar nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies de oxígeno reactivas que conducen al crecimiento de paño y destrucción de cartílago. Los factores participantes en la angiogénesis pueden contribuir activamente, y ayudar a mantener el estado crónicamente inflamado de la artritis reumatoide. Los factores asociados con la angiogénesis también tienen un papel en la osteoartritis, contribuyendo a la destrucción de la articulación. Varios factores, incluyendo el VEGF, han demostrado estar involucrados en la patogénesis o artritis reumatoide y osteoartritis.

Otro ejemplo importante de una enfermedad que involucra la vasculatura aberrante y la angiogénesis es la enfermedad neovascular ocular. Esta enfermedad se caracteriza por la invasión de nuevos vasos sanguíneos en las estructuras del ojo, tales como la retina o la córnea. Es la causa más común de ceguera y está involucrada en aproximadamente veinte enfermedades de los ojos. En la degeneración macular relacionada con la edad, los problemas visuales asociados están causados por un crecimiento interno de los capilares coroidales a través de defectos en la membrana de Bruch con proliferación de tejido fibrovascular debajo del epitelio del pigmento retinal. El daño angiogénico también se asocia con retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, rechazo a injerto córneo, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolental.

Otras enfermedades asociadas con neovascularización córnea que pueden ser tratadas de conformidad con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, queratoconjuntivitis epidérmica, déficit de Vitamina A, sobreuso de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratitis seca del pterigión, síndrome de Sjogrens, acné rosácea, filectenulosis, sífilis, infecciones por micobacterias, degeneración de lípidos, quemaduras químicas,

úlceras bacterianas, úlceras de hongos, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zoster, infecciones por protozoos, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, traumatismo, sarcoidosis de Wegeners, escleritis, enfermedad de Steven Johnson, queratotomía radial perifigoide, y rechazo de injerto de córnea.

Las enfermedades asociadas con la neovascularización retinal/coroidal que pueden ser tratadas de conformidad con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, retinopatía diabética, degeneración macular, anemia de células falciformes, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástico, enfermedad de Paget, oclusión de vena, oclusión de arteria, enfermedad obstructiva de carótida, uveítis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía de premadurez, enfermedad de Eales, enfermedad de Bechet, infecciones que causan una retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, enfermedad de Bests, miopía, manchas ópticas, enfermedad de Stargarts, pars planitis, desprendimiento de retina crónico, síndrome de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismo y complicaciones post-láser.

Otras enfermedades que pueden ser tratadas de conformidad con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por la proliferación anómala de tejido fibrovascular o fibroso que incluye todas las formas de vitreoretinopatía proliferativa, estén o no asociadas con la diabetes.

La inflamación crónica también implica angiogénesis patológica y vasculatura aberrante. Esta enfermedad se declara como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn que muestra cambios histológicos con el crecimiento interno de nuevos vasos sanguíneos hacia los tejidos inflamados. La bartonelosis, una infección bacteriana encontrada en Sudamérica, puede dar como resultado una etapa crónica que se caracteriza por la proliferación de las células endoteliales vasculares.

Otro papel patológico asociado con la vasculatura aberrante y la angiogénesis se encuentra en la aterosclerosis. Las placas formadas dentro del lumen de los vasos sanguíneos se ha mostrado que tienen actividad estimuladora angiogénica. Hay evidencia particular de la significación patofisiológica de los marcadores angiogénicos, tales como el VEGF, en la progresión de la aterosclerosis coronaria humana, así como en los procesos de recanalización en enfermedades coronarias obstructivas. La presente invención proporciona un tratamiento eficaz para dichas afecciones.

Una de las enfermedades angiogénicas más frecuentes en la infancia es el hemangioma. En la mayoría de los casos, los tumores son benignos y disminuyen sin intervención. En casos más graves, los tumores avanzan a formas grandes cavernosas e infiltrativas y crean complicaciones clínicas. Las formas sistémicas de los hemangiomas, las hemangiomatosas, tienen una tasa de mortalidad alta. Existen hemangiomas resistentes a la terapia que no pueden tratarse con las sustancias terapéuticas actualmente en uso, pero son abordados por la invención.

La angiogénesis también es responsable del daño encontrado en enfermedades hereditarias tal como la enfermedad de Osler-Weber-Rendu, o la telangiectasia hemorrágica hereditaria. Esta es una enfermedad heredada caracterizada por múltiples angiomas pequeños, tumores sanguíneos o de vasos linfáticos. Los angiomas se encuentran en la piel y en las membranas mucosas, frecuentemente acompañados con epistaxis (sangrados de nariz) o sangrado gastrointestinal y a veces con fístula arteriovenosa pulmonar o hepática.

La angiogénesis también participa en los procesos fisiológicos normales tales como la reproducción y la cicatrización de heridas. La angiogénesis es una etapa muy importante en la ovulación y también en la implantación de la blástula después de la fertilización. La prevención de la angiogénesis podría usarse para inducir la amenorrea, para bloquear la ovulación o para evitar la implantación por la blástula. En la cicatrización de heridas, la reparación excesiva o fibroplasia puede ser un efecto colateral perjudicial de los procedimientos quirúrgicos y puede ser causado o exacerbado por la angiogénesis. Las adherencias son una complicación frecuente de la cirugía y conducen a problemas tales como la obstrucción del intestino delgado. Esto puede ser tratado también por la invención.

Cada una de las enfermedades y trastornos anteriores junto con todos los tipos de tumores, se contemplan también para el tratamiento de conformidad de la presente invención. La patente US No 5,712,291 se incorpora específicamente en la presente memoria como referencia, para demostrar adicionalmente el conocimiento en la técnica de que una vez que se ha mostrado la inhibición de la angiogénesis usando un agente particular, el tratamiento de un intervalo extensivo de enfermedades asociadas con la angiogénesis aberrante, usando esos agentes y agentes similares, puede llevarse a cabo en forma razonable. La patente US No 6,524,583 demuestra particularmente que este principio aplica a la inhibición de la angiogénesis y al tratamiento de enfermedades angiogénicas usando compuestos terapéuticos a base de anticuerpos. Los efectos antiangiogénicos del anticuerpo 3G4 (ATCC 4545) en ratones que tienen tumores (figura 17A) es entonces una evidencia importante de que el 3G4 y anticuerpos similares son convenientes para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades angiogénicas.

La invención proporciona además composiciones y métodos para el uso en el tratamiento de otras enfermedades en las que los aminofosfolípidos y/o fosfolípidos aniónicos, particularmente la FS y FE, desempeñan cierto papel. Por ejemplo, ya que la FS se encuentra involucrada en la adhesión celular, respuestas inflamatorias y choque séptico, anticuerpos para la FS pueden ser usados en el tratamiento de la inflamación y del choque séptico. El uso del 3G4

(ATCC 4545) o anticuerpos similares se prefiere para esas realizaciones, particularmente un dímero de Fab de ese anticuerpo. Un dímero de Fab de duramicina se contempla también particularmente para el uso en el tratamiento del choque séptico.

Los aminofosfolípidos y/o los fosfolípidos aniónicos, particularmente la FS, se encuentran involucrados también en la anemia falciforme, en particular como parte del mecanismo de eliminación. Los anticuerpos para la FS pueden entonces ser usados para tratar o aminorar la anemia de células falciformes. El uso del 3G4 (ATCC 4545) o anticuerpos similares es preferido, particularmente un dímero Fab del mismo.
La mayoría de las bacterias expresan el fosfolípido aniónico, AF. Los anticuerpos que se unen al AF, opcionalmente con unión a otros fosfolípidos aniónicos, pueden ser usados entonces como agentes antibacterianos. Aunque los anticuerpos de la invención pueden ser preparados en *E. coli*, y por lo tanto no son bactericidas en todas las circunstancias, se cree que resulta un papel antibacteriano *in vivo* de la capacidad para fijar el complemento. Un anticuerpo intacto en vez que un fragmento de anticuerpo deberá entonces ser usado como un agente antibacteriano. El 3G4 (ATCC 4545) y los anticuerpos similares se prefieren para el uso en esas realizaciones, aunque se puede emplear cualquier anticuerpo que fije el complemento y que se una al AF, tal como otros anticuerpos de unión a AF de la tabla 4.

El síndrome antifosfolípidos y el lupus, trastornos autoinmunes en los que se producen anticuerpos contra los propios fosfolípidos del cuerpo, se encuentran asociados con los trastornos de coagulación, incluyendo abortos y trombocitopenia (recuentos bajos de plaquetas). Por consiguiente, los anticuerpos antifosfolípidos en estos pacientes son anticuerpos patógenos, que causan la trombosis. Los anticuerpos de la presente invención, no obstante, se unen a aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos sin exhibir esos efectos secundarios. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención se contemplan para el uso en el tratamiento del síndrome antifosfolípido, enfermedades asociadas y complicaciones de las mismas.

Los anticuerpos antifosfolípidos patógenos que circulan en pacientes con el síndrome antifosfolípido se cree que se unen a la FS, FE y a otros fosfolípidos en combinación con proteínas, tales como la β_2-glucoproteína I, protrombina, quininógenos, precalicreína y el factor XI (Rote, 1996; Sugi y McIntyre, 1995; 1996a; 1996b). La β_2-glucoproteína I y la protrombina unidas a la FS se describen como que son los antígenos principales para anticuerpos anticardiolipina y anticuerpos para el lupus, respectivamente.

Q. Conjugados y Derivados de Péptidos de Unión a la FE

Además de los anticuerpos e inmunoconjugados, la presente invención proporciona además derivados de péptidos de unión a la FE y varios usos, particularmente en el tratamiento de tumores y enfermedades virales. Construc- tos y derivados de péptidos de unión a la FE, actualmente preferidos, son aquellos basados en la duramicina terminada en un péptido. Tres categorías generales de péptidos de unión a la FE y derivados de duramicina son proporcionados por la invención, dos de las cuales usan el péptido o duramicina de unión a la FE, como la porción objetivo del construcción, y otros usan la duramicina o agente similar principalmente como la porción efectora del construcción.

El uso de los péptidos de unión a la FE, preferentemente la duramicina, como agentes de localización dirigida del objetivo, se basa en su capacidad para impartir una capacidad de unión selectivo a un cons- tructo resultante. Por consiguiente, una construcción o conjugado que contenga un péptido de unión a la FE, preferentemente duramicina, se unirá específicamente a las células que expresen la FE, tales como las células endoteliales vasculares de tumores, células de tumores malignos, células proliferantes y/o células viralmente infectadas.

Como los péptidos de unión a la FE, tales como la duramicina, tienen una actividad biológica además de la función de localización dirigida de la FE, no es necesario conjugar un péptido de unión a la FE tal como la duramicina a un agente terapéutico, para conseguir un conjugado terapéutico. Sin embargo, como los péptidos de unión a la FE, tales como la duramicina, se han asociado a toxicidades en su forma natural, el péptido deberá ser modificado para reducir la toxicidad. Las toxicidades están relacionadas con la capacidad de los péptidos para formar agrupaciones, formar poros en las membranas celulares, y permear o penetrar en general las células. Por consiguiente las funciones deberán ser atenuadas, para prevenir en forma significativa o sustancial el péptido de unión a la FE de la formación de agrupaciones, permeándose en la célula y siendo específicamente no tóxico. Preferentemente, aunque la capacidad para unirse a la FE se mantiene sustancialmente, la capacidad de los péptidos de unión a la FE para formar agrupaciones y penetrar en la célula es inhibida sustancialmente, reduciendo entonces significativamente o suprimiendo la citotoxicidad.

La primera categoría de los derivados de péptidos de unión a la FE con toxicidad reducida proporcionadas por la presente invención, es que el péptido de unión a la FE, preferentemente duramicina, se hace relativa o sustancialmente impermeable a las células. Esto se consigue uniendo un grupo impermeable a la célula, que puede ser un pequeño grupo con carga positiva o negativa o un grupo polar, puede ser de la forma de transportador inerte. Los términos "grupo impermeable a las células" y "péptido de unión a la FE impermeable a las células" tal como se usa en la presente memoria, son relativos más que absolutos, y se refieren a péptido de unión a la FE modificados, preferentemente duramicina, en los que la capacidad para formar agrupaciones y permear las células ha sido reducida en forma significa, y preferentemente en forma sustancial. La célula resultante impermeable a los péptidos de unión a

la FE puede funcionar atrapando la FE, y las moléculas de membranas asociadas, sobre el exterior de las células y/o haciendo que las defensas de las células huésped se contengan en las células recubiertas con el péptido.

Dentro de esta categoría de derivados de péptidos de unión a la FE, ciertas construcciones enfatizarán el reclutamiento de defensas del huésped, mejorando así su actividad terapéutica. Por ejemplo, cuando un péptido de enla- zamiento a la FE, preferentemente la duramicina, se une a una inmunoglobulina, la inmunoglobulina puede funcionar tanto como un transportador inerte como un efector inmune. Esto aplica a las inmunoglobulinas que poseen la llamada "especificidad irrelevante" y en los derivados de inmunoglobulina sin capacidad de unión al antígeno, tales como las regiones Fc. En virtud de la inmunoglobulina unida o del derivado de inmunoglobulina, esas construcciones podrán redireccionar las defensas del huésped contra las células que expresan la FE, atrayendo y/o activando las células efectoras inmunes.

En la segunda categoría general de los derivados de péptidos de unión a la FE, de la invención, los péptidos son modificados además para reducir la penetración de las células y toxicidad resultante, más que usar un pequeño grupo impermeable de las células o transportador inerte, se usa un agente que cambia la distribución de la sangre y el tejido, del construcción resultante. Ejemplos preferidos son aquellos en los que un péptido de unión a la FE, preferentemente duramicina, es unida a un agente de localización del objetivo que se une a un componente de una célula tumoral, vasculatura tumoral o intratumoral o estroma tumoral. Aunque el péptido de unión a la FE, mismo, tiene todavía una propiedad de localización del objetivo, en estos aspectos de la invención, el agente de localización del objetivo dirige principalmente la construcción al tejido diana, tal como al ambiente del tumor, y el péptido de unión unido a la FE, tal como la duramicina, ejerce un efecto terapéutico, al ser suministrado.

La tercera categoría general de los derivados de péptidos de unión a la FE regresa al uso del péptido de unión a la FE, preferentemente la duramicina, como un agente diana para localizar el derivado en las células que expresan la FE. Como las células viralmente infectadas expresan la FE en la superficie celular, opuesto a lo normal, las células no infectadas, que se unen al péptido de unión a la FE tal como duramicina, a un agente antiviral, proporcionará un agente antiviral diana eficaz. Aunque la porción de péptido de unión a la PE, preferentemente la duramicina, puede tener efectos terapéuticos adicionales, el agente antiviral unido se diseña para que sea el agente terapéutico principal en esas construcciones.

Cualquiera de las técnicas de conjugación descritas anteriormente pueden ser usadas para preparar derivados de duramicina de conformidad con la invención, incluyendo reticulantes, espaciadores de péptidos, construcciones de biotina: avidina y la expresión recombinante. Un sitio ventajoso para la unión con la molécula de duramicina, por ejemplo, es el resto de lisina en la posición del aminoácido 2 en la secuencia de duramicina (SEC ID NO: 9; figura 13P; Hayashi *et al.*, 1990). Sin embargo, la unión a este sitio no es un requerimiento de la invención.

Por consiguiente, los péptidos de unión a la FE, preferentemente la duramicina, pueden ser derivados para que tengan un grupo funcional disponible para propósitos de reticulación. Una amplia variedad de grupos puede ser usada en esta manera, por ejemplogrupos amina primarios o secundarios, grupos hidrazina o hidrazida, alcohol carboxílico, fosfato, carbamato y grupos de alquilación. Los agentes de unión incluyen los agentes antivirales, y pueden entonces conjugarse a través de un enlace de la base de Schiff, una hidrazona o con un enlace de hidrazona acílica o un enlazador de hidrazida (Patentes US Nos 5,474,765 y 5,762, 918).

Q1. Péptidos de Unión a la FE y Antimicrobianos

En esos aspectos de la invención puede usarse cualquiera de los péptidos de unión a la FE. Por ejemplo, se sabe que los quininógenos de bajo y alto peso molecular se unen a la FE. La proteína y las secuencias de ADN para una variedad de esas proteínas de unión, incluyendo las proteínas humanas, son conocidas en la técnica, facilitando el uso de los péptidos de unión a la FE a partir de la misma. Por ejemplo, los genes y proteínas humanas para los quininógenos de alto y bajo peso molecular, se describen en Kitamura *et al.*, (1985) y Kellermann *et al.*, (1986), cada una de las cuales se incorpora específicamente en la presente memoria como referencia.

La patente US No 6,312,694 describe ciertos conjugados de unión a la FE usando proteínas de unión a la FE tales como quininógenos, y fragmentos de unión a la FE de los mismos. En la patente US No 6,312,694, las proteínas de unión de la FE o los fragmentos de unión de la FE de la misma son unidas funcionalmente a agentes anticelulares, toxinas, y factores de cuagulación. En el presente caso los péptidos de unión a la FE están unidos atransportadores inertes, agentes de localización dirigida de tumores o agentes antivirales. Aunque los agentes de la presente para la unión y sus métodos de uso representan avances sorprendentes, la patente US No 6,312, 694 describe adicionalmente y permitir que los péptidos de unión a la FE, tales como los fragmentos de péptidos de unión a la FE de quininógenos, sean utilizados.

Los péptidos de unión a la FE, actualmente preferidos, para el uso en la invención, son aquellos basados en la molécula de unión a la FE, la duramicina. La duramicina (2622U90, Moli1901) es un péptido antimicrobiano de la familia de lantibióticos (patente US 4,452,782; Shotwell *et al.*, 1958; Nakamura y Racker, 1984), y otros miembros de la familia de lantibióticos pueden ser usados en la presente invención. En donde se usan los pép tidos de unión a la FE como el agente de direccionamiento al objetivo de la construcción, por ejemplo, cuando se une a un transportador

inerte o a un agente antiviral, un péptido de unión a la FE del lantibiótico deberá conservar sustancialmente la actividad de unión a la FE. Cuando se usa como un agente terapéutico en una construcción, particularmente cuando se une a un agente de localización del objetivo en el tumor, existe más tolerancia a cierta pérdida de la actividad de unión a la PE.

El análisis de un péptido candidato para confirmar o identificar sustancialmente esa unión a la FE es un asunto directo en vista a la presente descripción que puede ser conseguido, por ejemplo, usando cualquiera o más de los ensayos ELISA descritos en la presente memoria . Los lantibióticos para su uso como péptidos de unión a la FE en la presente memoria inhibirán preferentemente, y en forma sustancial, la misma actividad de unión de la FE que la duramicina, en forma incluso más preferente, exhibirán también sustancialmente la misma especificidad por la FE con respecto a los fosfolípidos como la duramicina. Esas propiedades pueden determinarse fácilmente en vista a la presente descripción, particularmente en los ejemplos de trabajo.

En base a los criterios anteriores, los lantibióticos siguientes pueden usarse como parte de las construcciones y conjugados de la presente invención: la duramicina, cinamicina, actagardina, ancovenina, epidermina, galidermina, lantiopeptina, mersacidina, nisina, Pep5 y subtilina. La duramicina es el péptido de unión a la FE más preferido para usos en todos los aspectos de la invención. La duramicina es un antimicrobiano, que ha sido sugerido también para el uso en el tratamiento del asma, bronquitis crónica e infección por Mycobacterium tuberculosis (Patentes US Nos 5,849,706; 5,716,931; 5,683,675; 5,651,957; y 5,512, 269) y fibrosis cística (McNulty *et al.*, 2003). Sin embargo, la duramicina no ha sido descrita o sugerida previamente para conjugación a un grupo impermeable a las células, particularmente por no usarse en el tratamiento de infecciones virales.

La cinamicina (Ro09-0198) es una molécula relacionada que se une a la FE (Wakamatsu *et al.*, 1986; Choung *et al.*, 1988a; 1988b). La cinamicina marcada ha sido usada como una sonda para estudiar el movimiento de la trans- bicapa de la FE (Aoki *et al.*, 1994; Emoto *et al.*, 1996) y la exposición de la FE durante la apoptosis de las células T *in vitro* (Emoto *et al.*, 1997; Umeda y Emoto, 1999). Sin embargo, los usos terapéuticos de los derivados de cina- micina de conformidad con la presente invención no han sido descritos o sugeridos previamente. Las composiciones farmacéuticas que contienen derivados de péptido de unión a la FE, de la invención, en base a la cinamicina, y varios usos médicos de los mismos, representan entonces un avance en la técnica, particularmente en donde esas composiciones sirvan para el uso en el tratamiento de infecciones virales.

Los siguientes péptidos antimicrobianos pueden ser usados también en los conjugados de la invención, particularmente como agentes terapéuticos unidos a los agentes de localización dirigida del tumor: cistibióticos, tales como la pediocina AcH/PA1, leucocina A/Ual 187, mesentericina Y 105, sacacina A, sacacina P, lactacina F, cereina 7/8 y carnobacteriocinas, tales como la carnobacteriocina A, BM1 y B2; y tiolbióticos, particularmente lactococcinas, tales como la lactococcina B, A, M^a, N^a, G^a y G.

Q2. Grupos Impermeables a las Células

La unión de un péptido de unión a la FE, preferentemente la duramicina, en un grupo impermeable a las células reducirá la capacidad de los péptidos para formar agrupaciones, impidiendo sustancialmente que el péptido de unión a la FE se filtre a las células normales y reduciendo así la toxicidad. La propiedad de unión de la FE se conserva, no obstante, de tal manera que los péptidos pueden localizar las células aberrantes o infectadas que tienen FE expuesta en la superficie.

Los grupos impermeables a las células, ejemplares, incluyen grupos que portan grupos con carga positiva o negativa a pH fisiológico, tales como sulfato, sulfonato, fosfato, carboxilo, fenólico, iones amonio cuaternario y grupos amina. Ejemplos adicionales son grupos polares, tales como los azúcares simples y los polisacáridos, aminoácidos y polialcoholes. La duramicina, en particular, puede estar unida a biotina para formar péptidos de unión a la FE tratados con biotina, los cuales pueden ser dispersados en una composición o medicamento farmacéutico, particularmente uno que sirva para el tratamiento de una infección viral. El grupo impermeable a la célula puede ser también un polipéptido, una proteína o inmunoglobulina, cualquiera que pueda desempeñar la función como transportador inerte o como un agente diana.

Q3.transportadores Inertes

Los péptidos de unión a la FE, preferentemente la duramicina, se pueden hacer impermeables a la célula mediante la unión a un transportador impermeable a la célula, inerte. Una amplia variedad de transportadores impermeables a las células, inertes, pueden ser conjugados a un péptido de unión a la FE, preferentemente a la duramicina, para preparar un péptido de unión a la FE, impermeable a la célula, siempre y cuando la actividad de enlaza- miento a la FE no sea destruida sustancialmente. Los transportadores inertes deberán ser preferentemente biológicamente compatibles, de manera tal que no den por resultado efectos significativamente externos con la administración a un animal o paciente.

Se pueden usar proteínas transportadoras, y proteínas ejemplares son las albúminas y globulinas. A menudo se preferirán la neutravidina y la estreptavidina. Los transportadores no proteicos pueden ser usados también, tales como los polímeros naturales o sintéticos, incluyendo los polisacáridos y el PEG.

En ciertas realizaciones el transportador será una inmunoglobulina o porción de la misma. Las inmunoglobulinas humanas (HIgG) se preferirán para la administración a humanos. Las inmunoglobulinas pueden impartir también funciones de localización dirigida al objetivo, como se analiza posteriormente. Como un transportador inerte, una inmunoglobulina es una de "especificidad irrelevante", porque no imparte al conjugado una función de localización dirigida al objetivo. Sin embargo, ciertas ventajas serán conseguidas aún mediante la selección de tipos particulares de inmunoglobulinas. Por ejemplo, la porción Fc de una inmunoglobulina puede ser usada para reclutar células inmunes huésped y por tanto para estimular en forma adicional a las defensas del huésped.

Q4. Agentes de Localización Dirigida al Objetivo

En vez que unirse a un transportador inerte, los péptidos de unión a la FE, preferentemente la duramicina, se pueden convertir en péptidos impermeables a las células uniéndose a un agente de localización dirigida del objetivo, en particular, uno que se enlace a un componente de una célula tumoral, a un tumor o una vasculatura intratumoral o estroma de tumor. El agente de localización dirigida del objetivo, se dirige a la construcción en el tejido diana, preferentemente el entorno del tumor, y el péptido de unión a la FE unido, preferentemente la duramicina, ejerce un efecto terapéutico en la administración.

Los agentes de localización dirigida al objetivo, apropiados, son componentes tales como anticuerpos y otros agentes, que se unen a una célula tumoral. Los agentes que se "unen a una célula tumoral" se definen en la presente memoria como agentes de localización dirigida del objetivo que se unen a cualquier componente o componentes accesible(s) de una célula tumoral, o que se une a un componente que por sí mismo se une, o se asocia de alguna otra manera con, una célula tumoral, como se describe adicionalmente en la presente memoria.

La mayoría de esos agentes de localización dirigida al objetivo, contra tumores, y los ligandos de unión, se contemplan como agentes, particularmente anticuerpos, que se unen a un antígeno o marcador del tumor en la superficie de la célula. Se conocen muchos de esos antígenos, como una variedad de anticuerpos para el uso en la unión al antígeno y en la localización dirigida del tumor. La invención incluye entonces agentes de localización dirigida que se unen a un antígeno de la superficie de la célula, del tumor, identificado, y/o que se une a una célula tumoral intacta. Los antígenos de la superficie celular del tumor, identificado, y las células de tumores intactas de la tabla I y tabla II de las Patentes US Nos 5,877, 289; 6,004,555; 6,036,955; 6,093,399 ilustran antígenos de la superficie celular del tumor, apropiados.

Ejemplos de regiones de unión a las células tumorales son aquellos que comprenden una región de enlaza- miento al antígeno de un anticuerpo que se une a un antígeno $p185^{HER2}$ del tumor de la superficie de la célula, una proteína de núcleo de mucina de leche, TAG-72, un antígeno de Lewis o antígeno carcinoembrionario (CEA). Otro grupo de regiones de unión de la célula tumoral son aquellas que comprenden una región de unión al antígeno de un anticuerpo que se une a un antígeno asociado con tumores que se unen al anticuerpo 9.2.27, OV- TL3, MOv18, B3 (ATCC HB 10573), KS1/4 (obtenido de una célula que comprende el vector pGKC2310 (NRRL B- 18356) o el vector pG2A52 (NRRL B-18357), 260F9 (ATCC HB 8488) o D612 (ATCC HB 9796). La D612 se describe en la patente US No 5,183,756, y tiene el número de acceso ATCC HB 9796; B3 se describe en la patente US No 5,242,813, y tiene el número de acceso ATCC HB 10573; y anticuerpos recombinantes y quiméricos KS1/4 se describen en la patente US No 4,975,369.

Componentes que pueden ser objetivo de células tumorales, incluyen además componentes liberados de células tumorales necróticas o dañadas de alguna otra manera, que incluyen los antígenos de las células tumorales citosólicas y/o nucleares. Este(estos) es(son) antígeno(s) intracelular(es) preferentemente insoluble(s) presente(s) en la célula que pueden ser inducidas para que sean permeables o en fantasmas de células que sustancialmente sean todas neoplásicas y normales, que no se encuentren presentes o accesibles sobre el exterior de las células vivientes normales de un mamífero.

Las Patentes US Nos 5,019,368, 4,861,581 y 5,882,626, expedidas a Alan Epstein y colegas, se incorporan específicamente cada una en la presente memoria para propósitos de referencia de cada descripción y enseñanza adicional de como hacer y usar los anticuerpos específicos para antígenos intracelulares que se pueden hacer accesibles a partir de células malignas *in vivo*. Los anticuerpos descritos son suficientemente específicos para componentes celulares internos de células malignas de mamífero, pero no para componentes de células externas. Objetivos ejemplares incluyen las histonas, pero todos los componentes intracelulares liberados específicamente de células tumorales necróticas se encuentran abarcados.

Con la administración a un animal o paciente con un tumor vascularizado, esos anticuerpos localizan las células malignas en virtud del hecho de que los tumores vascularizados naturalmente contienen células de tumores necróticos, debido al(los) proceso(s) de la remodelación del tumor que ocurren *in vivo* y causan que al menos una porción de las células malignas se vuelvan necróticas. Además, el uso de esos anticuerpos en combinación con otras terapias que mejoran la necrosis de tumores, sirve para mejorar la efectividad de la localización dirigida del objetivo, tal como se describió en la presente memoria.

Una variedad de agentes de localización dirigida del objetivo, apropiados, se encuentran disponibles para unirse a marcadores presentes en el endotelio y estroma de tumores, pero en gran medida ausentes de las células normales,

del endotelio y de los estromas. Para la localización dirigida del objetivo de la vasculatura de tumores, el anticuerpo de localización dirigida o ligando a menudo se unirá a un marcador expresado, o adsorbido por, o inducido o localizado de alguna otra manera, en los vasos sanguíneos intratumorales de un tumor vascularizado. Los "Componentes de la vasculatura de tumores" incluyen entonces tanto moléculas de la superficie celular endotelial, de la vasculatura del tumor, y cualquiera componentes de esos factores de crecimiento, pueden ser unidos a receptores o moléculas de la superficie de estas células. Las siguientes patentes son incorporadas específicamente en la presente memoria con referencia para los propósitos de complementar en forma adicional las descripciones actuales concernientes a la preparación y uso de agentes de localización dirigida, dirigidos contra, expresados, adsorbidos, inducidos, o marcadores localizados de la vasculatura del tumor: las Patentes US Nos 5, 855,866; 5,776,427; 5,863,538; 5,660,827; 5,855,866; 5,877,289; 6,004,554; 5,965,132; 6,036,955; 6,093,399; 6,004,555.

Ejemplos de agentes de localización dirigida del objetivo, expresados en la superficie del tumor, y vasos sanguíneos intratumorales, incluyen receptores de la superficie celular y moléculas de adhesión a células (Thorpe y Ran, 2000, véase la Tabla 1). Ejemplos adecuados incluyen la endoglina, localizada por ejemplo, TEC-4, TEC-11, E-9 y anticuerpos de Snef; E-selectina, localizada por ejemplo, por anticuerpos H4/18; VCAM-1 localizada por ejemplo por los anticuerpos E1/6 y 1.4c3; endosialina localizada por ejemplo por los anticuerpos FB5; $a_v\beta_3$ integrina, localizada por la LM609 y los agentes de localización dirigida de péptidos; el receptor del VEGF, VEGFR1, localizado en forma dirigida por ciertos números de anticuerpos, y particularmente por el VEGF; el complejo receptor VEGF; también localizado por cierto número de anticuerpos, tales como el 3E7 y GV39; y FS MA, localizado por anticuerpos tales como el J591. Ejemplos tales como la endoglina, receptores TGF_jS, E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1, un ligando reactivo con la LAM-1, un receptor VEGF/FPV, un receptor FGF, $a_v\beta_3$ integrina, pleiotropina, endosialina, son descritos adicionalmente y habilitados en las Patentes US Nos 5,855,866; 5,877,289; 6,004,555; 6,093,399.

Ejemplos adicionales, apropiados, incluyen los proteoglicanos tales como el NG2 y las metaloproteinasas de matriz (MMP), tales como la MMP2 y MMP9, cada una de las cuales es localizada en forma dirigida por los agentes de localización dirigida del péptido particular (Thorpe y Ran 2000). Estos son ejemplos de enzimas de remodelación que son expresadas como entidades a las que pueden ser dirigidas en el tumor, el cual es un sitio de remodelación vascular. Los objetivos apropiados, adicionales, son la trombomodulina, Thy-1 y cistatina. Secuencias de identificación de estudios, elevadas, en el endotelio de tumores, han sido también la trombomodulina identificada, MMP 11 (estromelisina), MMP 2 (gelatinasa) y varios colágenos como marcadores vasculares de tumores, los que pueden ser objetivos, que se encuentran también de conformidad con las patentes US Nos 6,004,555 y 6,093,399.

Otro objetivo apropiado es el PSMA (antígeno de la membrana específica de la próstata). El PSMA definido inicialmente por el anticuerpo monoclonal 7E11, se identificó originalmente como un marcador del cáncer de próstata y se conoce como una glicoproteína de membrana integral tipo 2. El anticuerpo 7E11 se une a un epítope intracelular del PSMA que, en células viables, no se encuentra disponible para la unión. En el contexto de la invención, el PSMA es localizado entonces de manera dirigida usando anticuerpos para el dominio extracelular. Esos anticuerpos reaccionan con el endotelio vascular de tumores, en una variedad de carcinomas incluyendo el cáncer de pulmón, colon y de mama, pero no con el endotelio vascular normal.

Muchos anticuerpos que se unen a un dominio externo del PSMA se encuentran disponibles fácilmente y pueden ser usados en la presente invención. Los anticuerpos monoclonales 3E11, 3C2, 4E10-1.14, 3C9 y 1G3 exhiben especificidades para diferentes regiones del dominio extracelular de la proteína PSMA y son convenientes para su uso en la presente invención. Tres anticuerpos adicionales para el dominio intracelular del PSMA son el J591, J415 y PEQ226.5, lo cual confirma la expresión del PSMA en la vasculatura asociada con el tumor y pueden ser usados en la invención. Dado que los ácidos nucleicos que codifican el PSMA, y variantes de los mismos, se encuentra fácilmente disponibles, Patentes US Nos 5,935,818 y 5,538,866, si se desea se pueden generar anticuerpos adicionales.

La patente US No 6,150,508, describe otros varios anticuerpos monoclonales que se unen al dominio extracelular de la PSMA, que pueden ser usados en la presente invención. Uno o más de los anticuerpos monoclonales ejemplares, reactivos con la PSMA expresada en la superficie celular pueden ser usados. Estos incluyen, el 3F5.4G6 (ATCC HB12060); 3D7-1.1 (ATCC HB12309); 4E10-1.14 (ATCC HB12310); 3E11 (ATCC HB12488); 4D8 (ATCC HB12487); 3E6 (ATCC HB12486); 3C9 (ATCC HB12484); 2C7 (ATCC HB12490); 1G3 (ATCC HB12489); 3C4 (ATCC HB12494); 3C6 (ATCC HB12491); 4D4 (ATCC HB12493); 1G9 (ATCC HB12495); 5C8B9 (ATCC HB12492); 3G6 (ATCC HB12485); y 4C8B9 (ATCC HB12492).

Anticuerpos adicionales, o porciones de unión de los mismos, que reconocen un dominio extracelular de la PSMA se describen en las Patentes US Nos 6,107,090 y 6,136,311. Cuatro líneas celulares de hibridoma se describen en particular, y son la E99, J415, J533 y J591 (ATCC HB-12101, HB12109, HB 12127, y HB-12126), cualquiera o más de las cuales pueden ser usadas entonces como agentes localizadores de objetivos, de conformidad con la invención reivindicada.

Agentes localizadores de objetivos que se unen a dianas “adsorbidas" son otro grupo apropiado tales como aquellos que se unen a los ligandos o factores de crecimiento que se unen a receptores de la superficie celular de la vasculatura de tumores o intratumoral. Esos anticuerpos incluyen entonces aquellos que se unen al VEGF, FGF, TGF3, HGF, PF4,

PDGF, TIMP o a una isoforma de fibronectina asociada con el tumor (Patentes US Nos 5,877, 289; 5,965,132; 6,093,399 y 6,004,555).

Otros anticuerpos de localización dirigida al objetivo, apropiados, o fragmentos de los mismos, son aquellos que se unen a epítopes que se encuentran presentes en complejos de ligando-receptor o complejos del factor de crecimiento-receptor, pero que se encuentran ausentes del ligando individual o del factor de crecimiento y del receptor. Esos anticuerpos reconocerán y se unirán a un complejo del ligando-receptor o de factor de crecimiento-receptor, como se presenta en la superficie celular, pero no se unirán al ligando libre o al factor de crecimiento del receptor no complejado. Un "complejo receptor del enlace", como se usa en la presente memoria se refiere entonces al complejo resultante, producido cuando un ligando o factor de crecimiento específicamente se une a este receptor, tal como el receptor del factor de crecimiento.

Estos aspectos son ilustrados por el complejo VEGF/receptor de VEGF. Esos complejos de ligando-receptor estarán presentes en un número significativamente mayor en células endoteliales asociadas con tumores que en las células endoteliales no asociadas con tumores, y pueden ser localizadas entonces en forma dirigida por anticuerpos anticomplejo. Los anticuerpos anticomplejo incluyen los anticuerpos monoclonales 2E5, 3E5 y 4E5 y fragmentos de los mismos.

Antígenos que pueden ser inducidos natural o artificialmente por las citocinas y coagulantes pueden ser también localizados en forma dirigida. Ejemplos de antígenos que pueden ser inducidos por la citocina son la E-selectina, VCAM-1, ICAM-1, endoglina, un reactivo ligando con LAM-1, e inclusive antígenos de MHC clase II, que son inducidos por el IL-1, IL-4, TNF-α, TNF-β o IFN-γ, que pueden ser liberados por los monocitos, macrófagos, células de mama, células T auxiliares, células T positivas CD8 y células NK o de tumores.

Antígenos adicionalmente inducibles incluyen aquellos que pueden ser inducidos por un coagulante, tal como la trombina, factor IX/IXa, factor X/Xa, factor de la plasmina o de la metaloproteinasa (matriz de metaloproteinasa, MMP). Generalmente los antígenos que pueden ser inducidos por la trombina serán utilizados. Este grupo de antígenos incluye la P-selectina, E-selectina, PDGF e ICAM-1, con la inducción y localización dirigida del objetivo de la P-selectina y/o E-selectina es la que se prefiere generalmente.

En otras realizaciones la vasculatura y agentes de localización dirigida de la estroma (ver más adelante) de la invención, serán agentes de localización dirigida del objetivo que por sí mismo son ligandos biológicos o porciones de los mismos, en vez que anticuerpos. "Ligandos biológicos" en este sentido serán moléculas que se unen o asocian con las moléculas de la superficie de la célula, tales como receptores, que pueden ser accesibles en el estroma en las células vasculares; como se ejemplifica mediante citocinas, hormonas, factores de crecimiento, y similares. Cualquiera de esos factores de crecimiento o ligandos pueden ser usados siempre y cuando se enlace al estroma o vasculatura asociada con la enfermedad, por ejemploa un receptor biológico específico, presente sobre la superficie de una célula endotelial de la vasculatura del tumor.

Factores de crecimiento apropiados para el uso en esos aspectos de la invención incluyen, por ejemplo, el VEGF/ FPV (factor del crecimiento endotelial vascular/factor de permeabilidad vascular), FGF (la familia de proteínas del factor del crecimiento de fibroblastos), TGF_jS (factor B del crecimiento de transformación), una isoforma de fibronectina asociada con el tumor, factor de dispersión/factor del crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de las plaquetas 4 (PF4), PDGF (factor del crecimiento derivado de las plaquetas), TIMP, o inclusive IL-8, IL-6 o factor XIIIa. A menudo se preferirá el VEGF/FPV y FGF.

Agentes de localización dirigida del objetivo, apropiados, adicionales, son aquellos que se unen al estroma asociada con el tumor. Durante la progresión del tumor, la matriz extracelular del tejido circundante es remodelada a través de dos procesos principales: la degradación proteolítica de los componentes de la matriz extracelular, del tejido normal; y la síntesis de novo de los componentes de matriz extracelular por las células tumorales y las células estromales activadas por las citocinas inducidas por el tumor. Estos dos procesos generan una "matriz extracelular del tumor" o "estroma del tumor", la cual es permisiva para el progreso del tumor y es cualitativa y cuantitativamente distinta de las matrices extracelulares o estromas de los tejidos normales.

El "estroma del tumor" tiene entonces componentes a los que se puede llegar mediante localización dirigida, que no se encuentran presentes en tejidos normales. Ciertos agentes para localización dirigida estromal, de tumores, preferidos, para el uso en la invención son aquellos que se unen a los marcadores de la membrana basal, al colágeno tipo IV, la laminina, al sulfato de heparano, al proteoglicano, a la fibronectina, a las plaquetas activadas, LIBS, RIBS y tenascina. Las siguientes patentes complementan aún adicionalmente las presentes descripciones con relación a la preparación y uso de agentes de localización dirigida, estromales, de tumores: Patentes US Nos 5,877,289; 6,093,399; 6,004,555; y 6,036,955.

Los componentes de estromas asociados con tumores, incluyen componentes estructurales y funcionales de los estromas, tejidos de la matriz extracelular y tejidos conectivos. Los agentes de localización dirigida de estromas de tumores incluyen entonces aquellos que se unen a los componentes tales como marcadores de la membrana de base,

colágenos tipo IV, laminina, fibrina, sulfato de heparano, proteoglicanos, glicoproteínas, polisacáridos aniónicos tales como los compuestos similares a heparina y la heparina misma, y las fibronectinas.

Anticuerpos útiles ejemplares son aquellos que se unen a la tenascina, una glicoproteína extracelular de peso molecular grande, expresada en la estroma de varios tumores benignos y malignos. Los anticuerpos antitenascina pueden ser usados entonces como agentes para localización dirigida del objetivo (Patentes US Nos 6,093,399 y 6,004,555).

Agentes de localización dirigida al objetivo, apropiados, adicionales, incluyen anticuerpos y ligandos que se unen a una célula de músculo liso, un pericito, un fibroblasto, un macrófago, y un linfocito o leucocito de infiltración. "Las plaquetas activadas" son componentes adicionales de los estromas de tumores, ya que las plaquetas se unen a los estromas cuando se activan, y esas plaquetas pueden ser entonces localizadas de manera dirigida mediante la invención.

Agentes de localización dirigida estromales, apropiados, adicionales, anticuerpos y región de la unión al antígeno, de las mismos, se unen a componentes de estromas de tumores "inducibles", tales como aquellas que pueden ser inducidas por las citocinas, y especialmente aquellas inducidas por coagulantes tales como la trombina. Un grupo de anticuerpos antiestromales, preferidos, son aquellos que se unen al RIBS, el sitio de unión inducido por el receptor, en fibrinógeno. El RIBS es entonces un antígeno que puede ser dirigido, la expresión de que en el estroma se detecta por plaquetas activadas. Los anticuerpos que se unen al LIBS, el sitio de unión inducido por el ligando, en las plaquetas activadas son también útiles.

Los elementos a los que se puede llegar de manera localizada, particularmente preferida, del estroma asociado con tumores, son comúnmente las isoformas de fibronectina asociada con tumores (FN). Las fibronectinas son constituyentes de glicoproteínas de alto peso molecular, multifuncionales, de matrices tanto extracelulares como también de fluidos corporales. Se encuentran involucradas en muchos procesos biológicos diferentes, tales como el establecimiento y mantenimiento de la morfología normal de las células, migración de las células hemostasis y trombosis, cicatrización de heridas y transformación oncogénica.

Las isoformas de fibronectina son ligandos que se unen a la familia de receptores de la integrina. Las "isoformas de fibronectina asociadas con tumores" pueden ser consideradas como una parte de la vasculatura del tumor y/o del estroma del tumor. Las isoformas de fibronectina tienen heterogeneidad estructural extensiva la cual se lleva a cabo en niveles de transcripción, post-transcripción y post-translación.

La diversidad estructural en las fibronectinas se lleva a cabo primero a través de la división alternativa de tres regiones (ED-A, Ed-B y IIICS) del transcripto de fibronectina primario, para generar al menos 20 isoformas diferentes. Así como están reguladas en una manera específica para el tejido y específica para el desarrollo, se sabe que el patrón de división de la fibronectina-pre-mRNA es desregulado en células transformadas y en células malignas. De hecho, las isoformas de fibronectina que contienen las secuencias de ED-A, ED-B y IIICS son expresadas en un mayor grado en las células tumorales transformadas en malignas, que en las células normales.

En particular, la isoforma de fibronectina que contiene la secuencia de ED-B (isoforma B+), se expresa en gran medida en tejidos fetales y de tumores, así como durante la cicatrización de heridas, pero es restringida en la expresión de tejidos de adultos normales. Las moléculas de fibronectinas B+ no son detectadas en vasos maduros, pero son reguladas positivamente en vasos sanguíneos angiogénicos en situaciones normales (por ejemploel desarrollo del endometrio) angiogénesis patológicas (por ejemploen retinopatía diabética) y en el desarrollo de tumores. La isoforma conocida como B+ de la fibronectina (B-FN) es entonces particularmente conveniente para el uso con la presente invención.

La secuencia de ED-B es una homología III de tipo completo de repetición codificada por un solo exón y que comprende 91 aminoácidos. La presencia de la isoforma B+, como tal, constituye un neoantígeno inducido por el tumor, pero además, la expresión de la ED expone un antígeno normalmente críptico dentro de la repetición 7 tipo III (precediendo a la ED-B); dado que este epítope no se encuentra expuesto en las moléculas de fibronectina carece de ED-B, y sigue a la expresión que induce la expresión ED-B neoantígenos tanto directa como indirectamente. Este sitio antigénico críptico forma el objetivo del anticuerpo monoclonal, BC-1 (Colección Europea de Cultivos de Células Animales, Porton Down, Salisbury, Reino Unido, número 88042101). El anticuerpo BC1 puede ser usado como un componente de localización dirigida vascular de la invención.

Anticuerpos mejorados con especificidad por la isoforma ED-B se describen en la WO 97/45544, incorporada en la presente memoria como referencia. Esos anticuerpos han sido obtenidos como Fvs de cadena sencilla (scFvs) de bibliotecas de regiones variables de anticuerpos humanos, exhibidas sobre la superficie del bacteriófago filamentoso (véase también la WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236 y WO 93/19172).

Usando una biblioteca de fagos de anticuerpos se pueden aislar scFvs específicos tanto mediante la selección directa en fragmentos de fibronectina recombinantes que contengan el dominio ED-B y en la ED-B misma cuando estos antígenos se encuentren recubiertos sobre una superficie sólida ("panorámica"). Estas mismas fuentes del antígeno han sido usadas también satisfactoriamente para producir scFvs "de segunda generación" con propiedades

mejoradas con relación a los clones relacionados en un proceso de "maduración por afinidad". Los scFvs aislados reaccionan de manera fuerte y específica con la isoforma B+ de la fibronectina humana, preferentemente sin tratamiento previo con N-glicanasa.

Los anticuerpos de la WO 97/45544 son contemplados entonces particularmente para el uso con la presente. En aplicaciones antitumores, estos dominios de unión al antígeno de anticuerpos humanos son ventajosos ya que tienen menos efectos secundarios al ser administrados a humanos. Los anticuerpos a los que se hace referencia se unen al dominio ED-B directamente. Preferentemente los anticuerpos se unen tanto a la fibronectina humana ED-B como a la fibronectina no humana ED-B, tal como a la de ratón, permitiendo el análisis y pruebas en modelos de animales. Los fragmentos de anticuerpos se extienden al Fv de cadena sencilla (scFv), Fab, Fab', F(ab')2. Fabc, Facb y diacuerpos. Anticuerpos mejorados de manera inclusive adicional, específicos para el dominio ED de la fibronectina, han sido producidos con constantes de disociación subnanomolares, como se describe en la WO 99/58570, y son entonces aún más preferidos para el uso con la presente. Estos agentes de localización del objetivo están ilustrados por el anticuerpo L19, descrito en la WO 99/58570, específicamente incorporada en la presente memoria como referencia con el propósito de enseñar cómo hacer y usar estos anticuerpos y anticuerpos relacionados. Estos anticuerpos tienen afinidad específica por un epítope característico del dominio ED-B de fibronectina y tienen afinidad mejorada para el epítope ED-B.

Esos anticuerpos recombinantes, mejorados, se encuentran disponibles en el formato scFv, a partir de una biblioteca que presenta el fago del anticuerpo. Además de H10 y L19, el último de los cuales tiene una constante disociación para el dominio ED-B de fibronectina, en el intervalo de concentraciones subnanomolares, las técnicas de la WO 99/58570, incorporadas específicamente en la presente memoria como referencia, pueden ser usadas para preparar anticuerpos similares. El aislamiento de los fragmentos de anticuerpos scFv humanos específicos para el dominio ED-B de la fibronectina a partir de bibliotecas de presentación de fagos de anticuerpos y el aislamiento de un fragmento de anticuerpo scFv humano que se une al ED-B con afinidad subnanomolar, se describen particularmente en los ejemplos 1 y 2 de la WO 99/58570.

Los anticuerpos preferidos incluyen entonces aquellos con afinidad específica por un epítope característico del dominio ED-B de fibronectina, en donde el anticuerpo tiene afinidad mejorada por el epítope ED-B, en donde la afinidad se encuentra en el intervalo subnanomolar, y en donde el anticuerpo reconoce la fibronectina ED-B(+). Otros formatos preferidos son aquellos en donde el anticuerpo es un scFv o anticuerpo recombinante y en donde la afinidad se mejora mediante la introducción de un número limitado de mutaciones en sus restos de CDR. Restos ejemplares que se van a mutar incluyen 31-33, 50, 52 y 54 de los dominios VH y los restos 32 y 50 de su dominio VL. Esos anticuerpos pueden unirse al dominio ED-B de la fibronectina con una Kd de 27 a 54 pM; como es ejemplificado por el anticuerpo L19 o formas de variantes funcionalmente equivalentes del L19.

Q5. Conjugados Antivirales

En condiciones normales, la FE no está expuesta en la superficie de las células. Sin embargo, en varios estados de enfermedades, la FE queda expuesta en la superficie de la célula de uno o más tipos de células. Por ejemplo, las células endoteliales dentro de la vasculatura de tumores se vuelven positivas a la FE y pueden ser localizadas en forma dirigida mediante productos terapéuticos dirigidos a la FE, tal como se muestra en la presente memoria, mediante el tratamiento exitoso de tumores usando el conjugado de duramicina para HuIgG. La FE queda expuesta también en la superficie de la célula de células infectadas viralmente, los cuales son entonces objetivos adicionales para la intervención terapéutica usando los derivados de péptido de unión a la FE de la invención. En efecto la presente solicitud muestra que los derivados de duramicina, tales como los ilustrados por aquellos relacionados con la biotina y HuIgG, son agentes antivirales eficaces tanto *in vitro* como *in vivo*.

Varios fármacos antivirales, incluyendo el AZT, aciclovir, ganciclovir, cidofovir (derivado de citosina) y nuevos fármacos antivirales, están limitados por la toxicidad/eficacia. En base a sus observaciones concernientes a los cambios en la FE durante la infección viral, y además en vista a la efectividad de los derivados de péptidos de unión a la FE originales, los inventores han abordado problemas en el campo antiviral, diseñando nuevos productos terapéuticos antivirales con toxicidad reducida y eficacia incrementada. En los nuevos productos terapéuticos antivirales de la invención, los fármacos antivirales se encuentran enlazados a los péptidos de unión a la PE, que funcionan para suministrar los fármacos antivirales enlazados, a células infectadas viralmente.

Además los inventores tienen las siguientes observaciones con respecto al desarrollo del péptido de unión a la PE, derivados antivirales de la invención. En la presente memoria se muestran datos para demostrar que los derivados de péptidos de unión a la PE, por ejemplola duramicina-L-biotina, son capturados por macrófagos *in vivo*, especialmente en el pulmón, inclusive después de la administración sistémica. En la infección muchos virus pasan primero a través de células del sistema de las células reticuloendoteliales (RES), y el macrófago es la principal célula para la captación viral. Por lo tanto, mediante la unión de fármacos antivirales a péptidos de unión a la FE tales como la dura- micina, el efecto antiviral del fármaco se dirige al tipo de célula primaria (macrófago) responsable de eliminar virus invasores.

Como los derivados de péptidos de unión a la FE se localizan en macrófagos, en el pulmón, después de la administración sistémica serán naturalmente eficaces. También se contempla la administración al pulmón a través de

medios más directos, incluyendo a través de aerosoles. Por tanto, la presente invención resuelve importantes deficiencias en el campo del tratamiento viral proporcionando remedios antivirales ampliamente aplicables y prácticos.

Los nuevos productos terapéuticos antivirales de la presente divulgación comprenden por tanto un péptido de unión a la FE, tal como duramicina, unido a un fármaco antiviral, preferentemente usando un enlace biológicamente liberable o hidrolíticamente lábil para la unión a los dos agentes. Cualquiera de una variedad de agentes antivirales, incluyendo cualquier agente desarrollado como un antiviral en el futuro, puede ser unido a un péptido de unión a la FE para formar un producto terapéutico antiviral, ventajoso, de conformidad con esta divulgación. Además, a los llamados agentes antivirales clásicos, otros inhibidores de ADN/ARN, pueden ser unidos también a un péptido de unión a la PE, para formar un producto terapéutico antiviral. Los agentes antivirales ejemplares se listan en la tabla G, cualquiera o más de los cuales pueden estar unidos a un péptido de unión a la FE para preparar un conjugado antiviral de la invención, o pueden ser usados en forma separada en las terapias de combinación antiviral de la divulgación.

TABLA G

Virus Comunes que Causan Enfermedades y Fármacos Antivirales		
Virus que Causan Enfermedades	Categoría de Fármacos	Fármacos Antivirales Ejemplares
Herpesvirus		Cidofovir, aciclovir, penciclovir (famciclovir), ganciclovir, desoxiguanosina, foscarnet, idoxuridina, tifluorotimidina, vidarabina, sorivudina
Retrovirus	Inhibidores nucleosídicos de la transcriptase inversa (RT)	Zidovudina, didanosina, zalcitabina, lamivudina, estavudina, abacavir, multinucléosido de resistencia A; multinucléosido de resistencia B
	Inhibidores no nucleosídicos de la RT	Nevirapina, delavirdina, efavirenz, Adefovir Dipivoxilo
	Inhibidores de proteasa	Indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir, amprenavir
	Antineoplásicos específicos para la fase del ciclo de la célula	Hidroxiurea (Hydrea , Bristol Myers-Squibb)
Hepatitis B		Ifosfato de desoxicitosina, trifosfato de lamivudina, trifosfato de enticitabina, difosfato de adefovir, trifosfato de penciclovir, trifosfato de lobucavir
Hepatitis C		Interferon alfa, ribavirina
Gripe A y B		Amantadina, rimantadine, zanamivir, oseltamivir

Dentro de la variedad de agentes y fármacos antivirales, actualmente se prefiere el AZT y cidofovir para la unión a un péptido de unión a la FE. Sin importar el fármaco antiviral seleccionado, el péptido de unión a la FE, el conjugado antiviral se unirá a los macrófagos en los pulmones, a células viralmente infectadas y puede unirse también a partículas del virus. Dependiendo del enlazador o de la tecnología de conjugación usada, los fármacos antivirales pueden ser liberados en la superficie de la célula diana y después pueden ser captados en la célula. Preferentemente el conjugado mismo es captado en la célula, tal como un macrófago o célula viralmente infectada. La captación puede ocurrir ya sea naturalmente o puede ser mediada por el virus. Una vez adentro de la célula, al igual que con un conjugado de anticuerpo, la hidrólisis del enlazador libera el agente antiviral activo.

Un ejemplo de una opción de enlace apropiada para un agente antiviral de duramicina-cidofovir, se presenta en la figura 13R. En este ejemplo el conjugado de duramicina-codofovir está diseñado para unirse a los macrófagos y ser capturado en la célula. La hidrólisis del enlazador conduce a la descomposición de fosfaramidato y liberación del cidofovir activo o un derivado permeable a la célula (R en la figura 13R) que se descompone en cidofovir.

Se pueden usar otras uniones que tengan enlaces biológicamente lábiles, tales como por ejemplo disulfuro lábil a ácidos, que se descomponga o hidrolice enzimáticamente. Por consiguiente, cualquier enlace liberable biológicamente o hidrolizable selectivamente puede ser usado en la unión de anticuerpos a agentes terapéuticos, con relación al péptido de unión a la FE, derivados antivirales de la invención. La elección del enlazador no está limitada por el péptido de unión a la FE, particular, tal como la duramicina, ya que el péptido puede ser derivado para introducir grupos funcionales permitiendo la unión del agente antiviral seleccionado, tal como se describió anteriormente.

R. Métodos de Tratamiento Antiviral

La invención proporciona además una variedad de anticuerpos, inmunoconjugados y derivados de péptidos de unión a la fE, opcionalmente conjugados con agentes antivirales, para el uso en el tratamiento de infecciones virales. Los regímenes de tratamiento, y particularmente las dosis, son en general como se describieron anteriormente para los aspectos de tratamiento del cáncer de la invención, adaptabilidad que es una ventaja de la invención en su conjunto. Aunque una comprensión del(de los) mecanismo(s) particular(es) de acción no es necesaria para llevar a la práctica el tratamiento antiviral de la invención, ciertas de las razones que soportan el tratamiento viral, tal como se encuentra respaldado por los ejemplos de trabajo de la presente invención, son de la siguiente manera.

Los mecanismos más importantes se creen relacionados con la replicación y activación viral de la célula hospedera. Durante la infección viral, el virus activa la célula durante su proceso de replicación adentro de la célula. Este proceso de activación de la célula es necesario para la replicación viral, tal como se muestra para los virus del herpes, de la hepatitis C y el HIV-1. La progresión viral activa la expresión genética, tanto viral como de la hospedera. Por ejemplo, la replicación del virus Pichinde y del virus Machupo es inhibida por la actinomicina D tarde en el ciclo de replicación, indicando que la transcripción genética de la célula huésped es necesaria para finalizar la replicación viral.

La activación de la célula hospedera por el virus causa que la célula externalice fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, tales como la FS y FE. En particular, los inventores piensan que la activación viral causa los flujos de Ca^{2+} hacia la célula, lo cual activa la escrambalasa, externalizando los fosfolípidos aniónicos y los aminofosfolípidos, particularmente la FS y FE. Los anticuerpos, derivados de péptidos conjugados que se unen a los fosfolípidos aniónicos y a los aminofosfolípidos, preferentemente la FS y FE, se unen e interfieren entonces en el proceso de activación, impidiendo que el virus pueda replicarse apropiadamente.

Los ejemplos de la presente invención muestran que la invención actúa tarde en el proceso de infección viral, bloqueando la maduración o egreso viral. Los estudios de los inventores muestran que el efecto inhibidor de los agentes de la invención es ampliamente aplicable, ya que se ha demostrado que funciona en virus que usan diferentes mecanismos de egreso. Por ejemplo, los ejemplos de la presente demuestran el bloqueo del virus del herpes (CMV), que escapa de las vesículas exocitóticas derivadas del aparato de Golgi, y bloquean el arenavirus (virus Pichinde) y paramixovirus (RSV), que brotan directamente de la membrana plasmática.

Las células viralmente infectadas externalizan fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, particularmente FS y FE, que son normalmente intracelulares, es decir que se encuentran confinadas a la superficie interior de la membrana plasmática. Durante el escape del virus, los fosfolípidos se redistribuyen en el sitio de escape, acomodando el pliegue de la membrana durante el brote viral o exocitosis de la membrana plasmática, y los fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos son externalizados durante este proceso. Los anticuerpos, derivados de péptidos y conjugados de la invención pueden unirse entonces a fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, externalizados, particularmente FS y PE, y bloquean el escape del virus de la célula infectada. La unión de las construcciones de la invención, a células viralmente infectadas, se muestra también en los ejemplos de la presente memoria.

Los anticuerpos, derivados de péptidos y conjugados de la invención pueden unirse además a los fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, externalizados, particularmente a la FS y FE, e interfieren con una o más rutas de señalización necesarias para la expresión y/o replicación genética viral.

Además, los viriones envueltos tienen probablemente por sí mismos fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, tales como la FS y FE, sobre su superficie externa. Dado que los virus carecen de una translocasa para mantener o establecer la asimetría del fosfolípido, se espera la exposición continua de fosfolípidos tales como la FS y FE. Los anticuerpos, derivados de péptidos y conjugados de la invención pueden causar así opsonización, unión al complementario, fagocitosis por células huésped tales como macrófagos y eliminación de las partículas de virus libres.

En un aspecto adicional de la invención, los virus necesitan probablemente fosfolípidos aniónicos y aminofos- folípidos para la infección y/o la formación de sincitios. Los anticuerpos derivados de péptidos y conjugados de la invención pueden bloquear adicionalmente estos aspectos del ciclo de vida viral, enlazándose a fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos.

Conforme con las ideas anteriores, y en vista a los ejemplos de la presente memoria, el espectro del tratamiento viral para la invención se extiende a cualquier virus, ya sea envuelto o no, ADN o ARN. Como los derivados y conjugados de péptidos de los anticuerpos de unión a fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, de la invención, bloquean al menos en parte de la replicación viral dentro de la célula, y/o previenen el escape del virus de las células, la invención no está limitada al tratamiento de virus envueltos solamente, y tampoco a algún virus en particular, lo cual es una ventaja importante. Por ejemplo, el trabajo publicado posteriormente a los reportes de la invención, de que la anexina V y vesículas de FS pueden inhibir la infección por VIH-1 de macrófagos, pero no pueden inhibir la invención por VIH-1 de las células T o inhibir otros virus, tales como el virus G de la estomátitis vesicular y el virus de leucemia de murino amfotrópico (Callahan *et al.* 2003).

Naturalmente, los anticuerpos, derivados de péptidos y conjugados de la invención, actúan en los virus envueltos, particularmente aquellos virus que tienen fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos, de FS y FE, sobre la superficie exterior de la envoltura, en donde los anticuerpos, derivados y conjugados de péptidos causan la eliminación viral y/o la inhibición de la entrada viral de células diana.

Un aspecto importante de la invención es entonces que puede ser aplicada universalmente y es apropiada para el tratamiento de virus recombinantes, manipulados por ingeniería y sintéticos, por ejemplo, creados como parte de bioterrorismo. En efecto, la invención no se encuentra limitada al tratamiento de animales y humanos. Como las categorías de huésped encontrados en los taxones de virus incluyen algas, arquios, bacterias, hongos, invertebrados, microplasma, plantas, protozoarios, espiroplasmas y vertebrados, la invención puede ser usada para inhibir una

infección y replicación viral en cualquier entorno, incluyendo el virus de importancia agrícola. El tratamiento de la infección viral y de enfermedades asociadas a invertebrados es actualmente preferido y cualquiera o más de los virus que se encuentran en la Tabla H, que infecten animales vertebrados, pueden ser inhibidos, y la infección resultante puede ser tratada usando la invención.

TABLA H

Virus de vertebrados		
Familia	Género	Especies Tipo
Adenoviridae	*Mastadenovirus* *Aviadenovirus* *Virus similar al virus de la fiebre porcina africana*	*Adenovirus 2 humano* *Adenovirus 1 de aves domésticas Virus de la fiebre porcina africana*
Arenaviridae	*Arenavirus* *Arterivirus*	*Virus de coriomeningitis linfocítica* *Virus de la arteritis equina*
Astroviridae	*Astrovirus*	*Astrovirus 1 humano*
Birnaviridae	*Aquabirnavirus* *Avibirnavirus*	*Virus de la necrosis pancreática infecciosa* *Virus de la enfermedad bursal infecciosa*
Bunyaviridae	*Bunyavirus* *Hantavirus* *Nairovirus* *Flebovirus*	*Virus de bunyamwera* *Virus de Hantaan* *Virus de la enfermedad ovejuna de Nabrobi* *Virus siciliano de la fiebre la mosca de arena*
Caliciviridae	*Calicivirus*	*Exantema vesicular de virus de porcino*
Circoviridae	*Circovirus*	*Virus de la anemia del pollo*
Coronaviridae	*Coronavirus* *Torovirus* *Deltavirus*	*Virus de la bronquitis infecciosa aviar* *Virus de Berne* *Virus de la hepatitis delta*
Filoviridae	*Filovirus*	*Virus de Marburgo*
Flaviviridae	*Flavivirus* *Pestivirus* *Virus similar al de la hepatitis C*	*Virus de la fiebre amarilla* *Virus de la diarrea bovina* *Virus de la hepatitis C*
Hepadnaviridae	*Orthofepadnavirus* *Avihepadnavirus*	*Virus de la hepatitis B* *Virus de la hepatitis B en patos*
Subfamilia Herpesviridae *Alphaherpesvirinae* *Subfamilia:* *Betaherpesvirinae* *Subfamilia:* *Gammaherpesvirinae*	 *Simplexvirus* *Varicellovirus* *Cytomegalovirus* *Muromegalovirus* *Roseolovirus* *Lymfocryptovirus* *Rhadinovirus*	 *Herpesvirus humano 1* *Herpesvirus humano 3* *Herpesvirus humano 5* *Citomegalovirus de ratón 1* *Herpervirus humano 6* *Herpesvirus humano 4* *Herpesvirus atelino 2*
Iridoviridae	*Ranavirus* *Lymfocystivirus* *Virus similar al virus del pez dorado*	*Virus de rana 3* *Virus de lenguado* *Virus del pez dorado 1*
Orthomyxoviridae	*Virus de la Gripe A, B* *Virus de la Gripe C* *Virus similar al Thogotovirus*	*Virus de la gripe A* *Virus de la gripe C* *Thogotovirus*
Papovaviridae	*Polyomavirus* *Papillomavirus*	*Poliomavirus de murino* *Papilomavirus de conejo cola de algodón (Shope)*
Subfamilia Paramyxoviridae *Paramyxovirinae* *Subfamilia Pneumovirinae*	*Paramyxovirus* *Morbillivirus* *Rubulavirus* *Pneumovirus*	*Virus 1 de la paragripe humana* *Virus del Sarampión* *Virus de las paperas* *Virus sincitial respiratorio humano*
Subfamilia Parvoviridae *Parovirinae*	 *Parvovirus* *Erythovirus*	 *Virus diminuto de ratones* *Virus B19*

Virus de vertebrados		
Familia	Género	Especies Tipo
	Dependovirus	*Virus 2 adenoasociado*
Picornaviridae	*Enterovirus* *Rinovirus* *Hepatovirus* *Cardiovirus* *Afthovirus*	*Poliovirus 1* *Rinovirus 1A humano* *Virus de la hepatitis A* *Virus de la encefalomiocarditis* *Virus O de la aftosa*
Subfamilia Poxviridae *Cordopoxvirinae*	*Ortopoxvirus* *Parapoxyvirus* *Avipoxvirus* *Capripoxvirus* *Leporipoxvirus* *Suipoxvirus* *Molluscipoxvirus* *Yatapoxvirus*	*Virus de la vacuna* *Virus de Orf* *Poxvirus de aves domésticas* *Poxvirus ovino* *Mixomavirus* *Poxvirus porcino* *Virus contagioso de moluscos* *Virus de tumores del mono de Yaba*
Reoviridae	*Ortoreovirus* *Orbivirus* *Rotavirus* *Coltivirus* *Aquareovirus*	*Reovirus 3* *Virus 1 de la lengua azul* *Rotavirus de simio SA11* *Virus de la fiebre de garrapata de colorado* *Virus de soleuca*
Retroviridae	*Retrovirus tipo B de mamífero* *Retrovirus tipo C de mamífero* *Retrovirus tipo C de aves* *Retrovirus tipo D* *Retrovirus Blv-htlv* *Lentivirus* *Spumavirus*	*Virus de tumor mamario de ratón* *Virus de la leucemia murina* *Virus de la leucosis aviar* *Virus del mono de Mason-Pfizer* *Virus de la leucemia bovina* *Virus de inmunodeficiencia humana 1* *Espumavirus humano*
Rhabdoviridae	*Vesiculovirus* *Lyssavirus* *Efemerovirus*	*Virus de la estomatitis vesicular de indiana* *Virus de la rabia* *Fiebre efímera de bovino*
Togaviridae	*Alfavirus* *Rubivírus*	*Virus de Sindbis* *Virus de la Rubéola*

El uso de la invención en el tratamiento de infecciones virales y enfermedades, asociadas en mamíferos, es preferido, particularmente en términos de animales valiosos o de valor, tales como caballos de raza y mascotas domésticas, y animales y pájaros usados para producir directamente (por ejemplocarne) o para producir indirectamente (por ejemplo, leche y huevos) para el consumo humano. Además del tratamiento humano, realizaciones ejemplares de la invención incluyen el tratamiento de caballos, perros, gatos y similares, el tratamiento de vacas, cerdos, jabalí, oveja, cabra, búfalo, bisonte, llama, venado, reno y otros animales grandes, así como sus crías incluyendo becerros y corderos.

El tratamiento de humanos es particularmente preferido, ya sea para virus que se presenten naturalmente o para aquellos creados por bioterrorismo. En términos de virus que se presenten naturalmente y las enfermedades resultantes, la invención se encuentra nuevamente ilimitada a sus aplicaciones. Por consiguiente uno o más de los virus de la Tabla J pueden ser inhibidos usando la presente invención y las infecciones resultantes y enfermedades así tratadas.

TABLA J

Enfermedades Virales en Seres Humanos		
Enfermedad	Virus	Tipo de virus
SIDA	Virus de Inmunodeficíencia Humana (VIH)	Retrovirus
Broncolitis y pneumonia viral	Virus sincitial respiratorio	Paramyxovirus
Bronquiolitis	Virus de la paragripe	Paramyxovirus
Cáncer de cuello uterino	Virus del papiloma humano	Papovavirus
Varicela	Virus Zóster de la varicela	Herpesvirus
Dengue	Virus del dengue	Flavivirus
Fiebre hemorrágica de ébola	Virus del Ébola	Filovirus
Herpes genital	Virus-2 del herpes Simplex	Herpesvirus
Fiebre hemorrágica por Hantavirus	Hantavirus	Bunyavirus
Hepatitis	Hepatitis A	Picornavirus
	Hepatitis B	Hepadavirus

Enfermedades Virales en Seres Humanos		
Enfermedad	Virus	Tipo de virus
	Hepatitis C	Flavivirus
	Hepatitis D	Deltavirus
	Hepatitis E	Caleivirus
Gripe	Virus de la gripe A, B y C	Orthotmyxovirus
Fiebre hemorrágica Argentina de Junin	Virus de Junin	Arenavirus
Fiebre hemorrágica de Lassa	Virus de Lassa	Arenavirus
Enfermedad	Virus	Tipo de virus
Fiebre hemorrágica de Machupo	Virus de Machupo	Arenavirus
Sarampión	Virus de la rubéola	Paramyxovirus
Mononucléosis	Virus de Epstein Barr	Herpesvirus
Enfermedad por CMV (neumonía viral, síndrome similar a la mononucleosis)	Citomegalovirus	Herpesvirus
Síndrome Respiratoria Aguda Severa (SARS)	Coronavirus humano	Coronavirus
Herpes Zóster	Virus zóster de la varicela	Herpesvirus
Viruela	Virus de la variola	Poxvirus
Fiebre amarilla	Virus de la fiebre amarilla	Flavivirus
Enfermedad del Nilo occidental	Virus del Nilo occidental	
Encefalitis equina occidental	Virus EE occidental	Togavirus
Neumonía, hepatitis, enfermedad respiratoria aguda	Adenovirus	Adenovirus
Gastroenteritis	Rotavirus	Rotavirus
Encefalitis	Virus de la selva de Semliki	Alfavirus
Viruela bovina	Virus de la vacuna	Poxvirus
Encefalitis	EE Venezolano	Alfavirus
Enfermedad	Virus	Tipo de virus
Meningitis, encefalitis, meningoencefalitis	Coriomeningitis linfocítica	Arenavirus
Fiebre hemorrágica venezolana	Virus de Guanarito	Arenavirus
Fiebre del valle del Rift (fiebre hemorrágica, encefalitis)	Virus de la fiebre del valle de Rift	Bunyavirus
Fiebre hemorrágica Marburgo	Virus de Marburgo	Filovirus
Encefalitis transmitida por garrapatas	Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV)	Flavivirus
Encefalitis	Virus Hendra	Paramyxovirus
Encefalitis	Virus Nipah	Paramyxovirus
Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo	Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo	Bunyavirus
Fiebre hemorrágica brasileña	Virus Sabia	Arenavirus

La invención se contempla particularmente para el uso en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el CMV tales como la neumonía viral, el síndrome similar a la mononucleosis, y malformaciones congénitas asociadas (sordera y retardo mental); enfermedades respiratorias, tales como aquellas causadas por el RSV, incluyendo la bronquiolitis y neumonía viral, gripe, el resfriado común y el SARS; SIDA; hepatitis, cánceres asociados con infecciones virales; mononúcleosis; y viruela.

En otras realizaciones los inventores contemplan particularmente la inhibición de arenavirus, que son patógenos para el hombre. Los arenavirus incluyen los virus del mundo antiguo responsables de la fiebre de Lassa (virus de Lassa) y el de la coriomeningitis linfocítica (LCMV). La fiebre de Lassa es endémica en Africa occidental y afecta hasta 300,000 personas anualmente y causa hasta 3,000 muertes. La infección con la fiebre de Lassa conduce a fiebre y malestar por aproximadamente 10 días. Dolor abdominal, náuseas, vómito y diarrea son comunes. Se puede desarrollar faringitis y tos. Los síntomas neurológicos son usualmente ligeros. Los síndromes de fuga vascular, tales como edema y efusiones pleurales, se encuentran presentes en casos más graves. El sangrado se observa aproximadamente en una cuarta parte de los pacientes. La enfermedad puede causar cambios en el sistema cardiovascular que culminan con choque y muerte.

Los arenavirus incluyen también los virus del nuevo mundo antigénicamente distintos, responsable de la fiebre hemorrágica de Argentina (virus de Junin), fiebre hemorrágica Boliviana (virus de Machupo) y fiebre hemorrágica de Venezuela (virus de Guanarito). Todos estos virus se encuentran en la lista de la categoría A de CDC de armas potenciales para bioterrorismo.

Aunque no se encuentren relacionados con los aminofosfolípidos o fosfolípidos aniónicos, otros anticuerpos que se unen a los virus directamente han sido desarrollados en fármacos aprobados. Esto es cierto con respecto al Cyto- Gam el cual se usa para suprimir infecciones por CMV en pacientes inmunosuprimidos, y Synagis, el cual se usa para proteger infantes recién nacidos contra el virus sincitial respiratorio. Por lo tanto no hay problema de usar anti-cuerpos monoclonales para lograr acceso y neutralizar virus en tejidos.

Las dosis que son apropiadas para las realizaciones antitumorales son también apropiadas para los tratamientos antivirales. Similarmente se puede usar la administración múltiple para infecciones crónicas, y se pueden usar dosis elevadas para infecciones agudas. Se puede emplear cualquier vía de administración apropiada, nuevamente como se describió para los aspectos del tratamiento del cáncer, incluyendo IV, IM, SC, como un atomizador para los pulmones o vías respiratorias y similares.

Los productos terapéuticos proporcionados por la invención son agentes valiosos que tienen un amplio espectro de actividad antiviral. Además de ser eficaces contra un gran número de virus potencialmente letales, los agentes pueden ser administrados también después de la exposición al virus, inclusive en entornos en donde no se conozca la naturaleza exacta del virus. De esta manera los productos terapéuticos antivirales de la invención no requieren de un período prolongado entre la identificación del patógeno y la administración de la terapia, en marcado contraste con el tiempo y gasto que conlleva el desarrollo, producción o suministro de vacunas específicas.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los experimentados en la técnica apreciarán que las técnicas descritas en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por el inventor para que funcionen bien en la práctica de la invención, y por lo tanto pueden ser consideradas parte constituyente de modos preferidos para su práctica. Sin embargo los experimentados en la técnica apreciarán, en vista a la presente descripción, que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y obtener aún un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLO I (ejemplo de referencia)

Tratamiento de Tumores con Coaguligando Anti-VCAM-1-tTF

El presente ejemplo muestra la coagulación específica de la vasculatura de tumores *in vivo* que resulta después de la administración de un coagulante dirigido a la vasculatura del tumor ("coaguligando") a animales que contengan tumores y los efectos antitumorales resultantes. En este coaguligando, se usa un anticuerpo dirigido a la VCAM-1 (molécula-1 de adhesión endotelial vascular, VCAM-1) como un agente de localización dirigida para suministrar el Factor Tisular Truncado (tTF), una forma modificada de un coagulante humano, a la vasculatura del tumor.

El hibridoma MK2.7, que segrega un anticuerpo IgGi de rata contra VCAM-1 de murino, fue obtenido del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD; ATCC CRL 1909). El hibridoma R187, que segrega un anticuerpo IgG_1 de rata contra la proteína viral de murino p30 pag, se obtuvo también de la ATCC, y se usó como un control igualado al isotipo, para el anticuerpo anti-VCAM-1.

Los vasos sanguíneos de los principales órganos y un tumor de ratones que contenían tumores de Hodgkin humano L540, subcutáneo, fueron examinados inmunohistoquímicamente con respecto a la expresión de la VCAM-1 usando un anticuerpo anti-VCAM-1. En términos generales, se observó la expresión de la VCAM-1 en una cantidad del 20 al 30% de los vasos sanguíneos totales del tumor, teñidos por el anticuerpo antiendoglina, MJ 7/18, usado como un control positivo. La expresión vascular constitutiva de la VCAM-1 se encontró en el corazón y pulmones tanto en animales que contenían tumores como en animales normales. Se observó una fuerte tinción estromal en la cabeza en donde la expresión de la VCAM-1 fue estrictamente extravascular.

Ratones que contenían tumores L540 subcutáneos fueron inyectados por vía intravenosa con anticuerpo anti-VCAM-1, y dos horas después se desangraron los ratones. El tumor y los órganos normales se extirparon y se prepararon secciones congeladas y se examinaron inmunohistoquimicamente para determinar la ubicación del anticuerpo. El anticuerpo anti-VCAM-1 fue detectado sobre el endotelio del tumor, corazón y pulmón. La tinción fue específica ya que no se observó tinción del endotelio en el pulmón y en los órganos de ratones inyectados con un anticuerpo del mismo isotipo de la especie, de especificidad irrelevante, R187. Ninguna localización del anticuerpo anti-VCAM-1 fue encontrada en la cabeza o algún órgano normal excepto el corazón y pulmón.

Se preparó un conjugado anti-VCAM-1• tTF o "coaguligando" usando el factor tisular truncado (tTF). La administración intravenosa del coaguligando anti-VCAM-1• tTF induce la trombosis selectiva de vasos sanguíneos de tumor, en vez que vasos en tejidos normales, en ratones que contengan tumores.

El coaguligando anti-VCAM-1• tTF fue administrado a ratones que contenían tumores L540 subcutáneos de 0.4 a 0.6 cm de diámetro. Antes de la inyección del coaguligando, los tumores eran sanos, tenían una morfología uniforme que carecía de regiones de necrosis. Los tumores estaban bien vascularizados y tenían una ausencia completa de vasos con trombosis espontánea o hemorragias. En cuatro horas de inyección del coaguligando, del 40 a 70% de los vasos sanguíneos habían sufrido trombosis, a pesar de la tinción inicial de sólo el 20 al 30% de los vasos sanguíneos del

tumor. Los vasos que habían sufrido trombosis contenían agregados plaquetarios oclusivos, eritrocitos empacados y fibrina. En varias regiones los vasos sanguíneos se habían roto, derramando eritrocitos hacia el intersticio del tumor.

Veinticuatro 24 horas después de la inyección del coaguligando, los vasos sanguíneos se encontraron aún ocluidos y se había generalizado una hemorragia extensiva en todo el tumor. Las células tumorales se habían separado unas de otras, tenían núcleos picnóticos y se encontraban sufriendo citólisis. En 72 horas fue evidente una necrosis avanzada en todo el tumor. Es muy probable que la deposición de trombina inducida por el coaguligando, inicial, diese por resultado una inducción incrementada del antígeno objetivo VCAM-1 en los vasos centrales, amplificando así la localización dirigida y la destrucción del tumor.

La acción trombótica de anti-VCAM-1• tTF en vasos del tumor, era específica para el antígeno. Ninguno de los reactivos de control administrados a cantidades equivalente (tTF solo, anti-VCAM-1 solo, tTF más anticuerpo anti-VCAM-1 o el coaguligando de control de especificidad irrelevante) causaron trombosis.

Además de la trombosis de los vasos sanguíneos del tumor, este estudio muestra también que la administración intravenosa del coaguligando anti-VCAM-1• tTF no indujo trombosis de los vasos sanguíneos en los órganos normales. A pesar de la expresión de la VCAM-1 en vasos en el corazón y pulmones de ratones que contenían tumores L540 o ratones normales, la trombosis no ocurrió después de la administración de coaguligando anti-VCAM-1• tTF. No se observaron signos de trombosis, daño a tejidos o morfología alterada, en 25 ratones inyectados con una cantidad de 5 a 45 g de coaguligando 4 o 24 horas antes. Hubo una aparición histológica normal, del corazón y pulmón del mismo ratón que tuvo trombosis de tumor principal. Todos los otros órganos (cerebro, hígado, riñón, bazo, páncreas, intestino, testículos) también tuvieron una morfología inalterada.

Secciones congeladas de órganos y tumores de ratones tratados con coaguligando, dieron patrones de teñido coincidentes cuando se desarrollaron ya sea con el anticuerpo anti-TF, 10H10, o anticuerpo IgG de antirata y confirmaron que el coaguligando se había localizado en los vasos en el corazón, pulmón y tumor. La intensidad de teñido fue igual a aquella observada cuando se aplicó el coaguligando directamente a secciones a concentraciones altas seguido del desarrollo con anti-TF o IgG antirata, indicando la saturación de la unión que se había conseguido *in vivo*.

Estos estudios muestran que la unión al coaguligando a la VCAM-1 en la vasculatura normal en el corazón y pulmones no es suficiente para inducir trombosis, y que la vasculatura del tumor proporciona factores adicionales para soportar la coagulación.

La actividad antitumoral del coaguligando anti-VCAM-1• tTF fue determinada en ratones SCID que contenían tumores L540 con un volumen de 0.3 a 0.4 cm^3. El fármaco se administró por vía intravenosa 3 veces a intervalos de 4 días. El volumen promedio de los tumores de los ratones tratados con anti-VCAM-1• tTF fue reducido significativamente a 21 días de tratamiento ($P < 0.001$) en comparación con otros grupos. Nueve de un total de 15 ratones tratados con el coaguligando específico mostró más de 50% de reducción en el volumen del tumor. Este efecto fue específico dado que el tTf no conjugado, el coaguligando IgG de control y mezclas de anticuerpo anti-VCAM-1 libre y tTf no afectó el crecimiento del tumor.

EJEMPLO II

Expresión de la Fosfatidilserina en los Vasos Sanguíneos de Tumores

Para explicar la carencia del efecto trombótico del anti-VCAM-1• tTF en la vasculatura positiva a la VCAM-1 en corazón y pulmones, algunos inventores desarrollaron un concepto de localización diferencial del aminofosfolípido y fosfolípido aniónico, por ejemplola FS y la FE, entre los vasos sanguíneos normales y de tumores. Específicamente, elaboraron la hipótesis de que las células endoteliales en los tejidos normales segregan aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, preferentemente FS y FE, a la superficie interior de la bicapa de fosfolípidos de la membrana plasmática, en donde FS puede participar en reacciones trombóticas; mientras que las células endoteliales en tumores se translocan a aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos en la superficie externa de la membrana plasmática, en donde FS puede soportar la acción de coagulación del coaguligando. La expresión de la FS sobre la superficie de la célula permite la coagulación porque permite la unión de factores de coagulación a la membrana y coordina el ensamblaje de complejos de inicio de la coagulación.

El modelo de los inventores, de la translocación de los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, a la superficie de las células endoteliales de vasos sanguíneos de tumores, como se ha desarrollado en la presente memoria, es sorprendente porque la expresión del FS no ocurre después ni desencadena inevitablemente la muerte celular. La expresión del aminofosfolípido y fosfolípido aniónico, en la superficie de células endoteliales del tumor, es entonces significativamente estable para permitir que los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, por ejemplo, la FS y la FE, sirvan como entidades a las que se puede llegar en forma dirigida para la intervención terapéutica.

Para confirmar la hipótesis de que el endotelio de los vasos sanguíneos de tumores expresan la FS sobre la superficie luminal de la membrana plasmática, los inventores usaron el siguiente estudio inmunohistoquímico para determinar la distribución del anticuerpo anti-FS después de la inyección intravenosa en ratones que contienen el tumor L540.

A. Métodos

Anticuerpos anti-FS y anticardiolipina, ambos anticuerpos IgM monoclonales de ratón, fueron producidos y caracterizados por Rote *et al.*, (1993) como se describió en el ejemplo IV. La reactividad principal del 3SB es de la FS, pero también tiene reactividad con el fosfolípido aniónico, el ácido fosfatídico, un componente relativamente minoritario de la membrana plasmática segregado también estrechamente en la laminilla interna en células normales.

Ratones que contenían tumores L540 recibieron una inyección intravenosa de 20 µg bien de anticuerpos IgM de ratón anti-FS o de anticardiolipina. Después de 10 minutos los ratones se anestesiaron y sus circulaciones sanguíneas se perfundieron con solución salina heparinizada. Los tumores y los tejidos normales se extirparon y se congelaron. Secciones en serie de órganos y tumores se tiñeron ya sea con IgM antiratón marcado con HRP para la detección del anticuerpo anti-FS o con anticuerpo anti-VCAM-1 seguido de Ig de antirata marcada con HRP.

Para conservar los fosfolípidos de la membrana sobre secciones congeladas, se desarrolló el siguiente protocolo. Los animales se perfundieron con DPBS que contenía Ca^{2+}2,5 mM. Los tejidos se montaron sobre portaobjetos recubiertos de 3-aminopropiltrietoxisilano y se tiñeron en 24 horas. No se usaron disolventes orgánicos, formaldehído o detergentes para la fijación o lavado de los portaobjetos. Los portaobjetos se rehidrataron mediante DPBS que contenía Ca^{2+} 2,5 mM y gelatina al 0.2%. También se usó la misma solución para lavar secciones a fin de mover el exceso de reactivos. Las secciones se incubaron con IgM antiratón marcada con HRP durante 3,5 horas a temperatura ambiente para detectar la IgM anti-FS.

B. Resultados

Este estudio inmunohistoquímico demostró que el anticuerpo anti-FS localizado en 10 minutos en la mayor parte de los vasos sanguíneos del tumor, incluyendo los vasos en la región central del tumor que podían carecer de VCAM- 1. Los vasos que fueron positivos para la VCAM-1 fueron también positivos para la FS. De esta manera existe una expresión coincidente de la FS en vasos que expresan la VCAM-1 en tumores.

En los estudios de localización *in vivo* no se tiñó ningún vaso en órganos normales, incluyendo la vasculatura positiva a la VCAM-1, del corazón y pulmón, lo cual indicó que la FS se encontraba ausente de la superficie externa de las células endoteliales. Por otro lado, cuando las secciones de tejidos normales y tumores se tiñeron directamente con anticuerpo anti-FS *in vitro*, no se encontraron diferencias visibles entre tipos de células normales y de tumores, endoteliales u otros tipos de células, mostrando que la FS se encuentra presente dentro de estas células pero únicamente llega a expresarse sobre la superficie de células endoteliales en tumores.

La especificidad de la detección de la FS fue confirmada por dos estudios independientes. Primero, un anticuerpo monoclonal IgM de ratón, dirigido contra un lípido cargado negativamente diferente, la cardiolipina, no llegó al tumor o a cualquier órgano *in vivo*. Segundo, el pretratamiento de secciones congeladas con acetona suprimió la tinción con el anticuerpo anti-FS, supuestamente porque extrajo los lípidos junto con el anticuerpo anti-FS unido.

EJEMPLO III

La Anexina V Bloquea la Actividad del Coaguligando

El presente ejemplo proporciona evidencia adicional del papel de la expresión de la FS en la superficie, en la actividad del coaguligando, a partir de estudios que usan el ligando de unión a la FS, de alta afinidad, la anexina V, para bloquear la función de la FS *in vitro* e *in vivo*.

A. La Anexina V bloquea la Activación del Factor X por el Coaguligando In Vitro

La capacidad de la anexina V para afectar la formación del factor Xa inducido por el coaguligando, fue determinada por un ensayo cromogénico. Células bEnd.3 estimuladas por el IL-1a fueron incubadas con anti-VCAM-•tTF y permeabilizadas por saponina. Se añadió anexina V a concentraciones que variaban desde 0.1 hasta 10 µg/ml y las células se incubaron durante 30 minutos antes de la adición de Proplex T diluido. La cantidad del factor Xa generado en presencia o ausencia de anexina V fue determinada. Cada tratamiento fue realizado por duplicado y repetido al menos dos veces.

La necesidad de la expresión de la FS en la superficie, en la acción del coaguligando es indicada adicionalmente por el descubrimiento de los inventores de que la anexina V, la cual se une a la FS con alta afinidad, bloquea la capacidad del anti-VCAM-1•tTF unido a las células bEnd.3 para generar el factor Xa *in vitro*.

La anexina V adicionada a células permeabilizadas, preincubadas con anti-VCAM-1•tTF inhibió la formación del factor Xa en una manera dependiente de la dosis. En la ausencia de Anexina V, el coaguligando enlazado a las células produjo 95 ng del factor Xa por cada 10,000 células por 60 minutos. La adición de cantidades crecientes de Anexina V (en el intervalo de µg por ml) inhibió la producción del factor Xa. A razón de 10 µg por ml, la Anexina V inhibió la producción del factor Xa en 58%. No se observó inhibición adicional al incrementar la concentración de Anexina V durante el ensayo, lo cual indicó que la anexina V saturó todos los sitios de unión disponibles a razón de 10 µg por ml.

B. La Anexina V bloquea la Actividad del Coaguligando In Vivo

La capacidad de la Anexina V para inhibir la trombosis inducida por el coaguligando, *in vivo*, fue examinada en ratones SCID que contenían el tumor L540 de Hodgkin. Los tumores se cultivaron en ratones y se inyectaron dos ratones por grupo (tamaño del tumor de 0.5 cm de diámetro, por vía intravenosa, a través de la vena de la cola con uno de los siguientes reactivos: a) solución salina; b) 100 µg de Anexina V; c) 40 µg de anti-VCAM-1tTF; d) 100 µg de Anexina V seguida 2 horas después por 40 µg de anti-VCAM-1•tTF.

Cuatro horas después de la última inyección los ratones fueron anestesiados y perfundidos con solución salina heparinizada. Los tumores se retiraron, se fijaron con formalina al 4%, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina. El número de vasos sanguíneos que habían sufrido trombosis y que no habían sufrido trombosis, se contó y se calculó el porcentaje de trombosis.

La anexina V bloquea también la actividad del coaguligando anti-VCAM-1•tTF *in vivo*. Los grupos de ratones que tenían fueron tratados con uno de los reactivos de control o de prueba. A los ratones se les proporcionó (a) solución salina; (b) 100 µg de Anexina V; (c) 40 µg de coaguligando anti-VCAM-1•tTF; o (d) 100 µg de Anexina V seguido 2 horas después por 40 µg de coaguligando anti-VCAM-1•tTF. Se obtuvieron resultados idénticos en ambos ratones por grupo.

No se observó trombosis espontánea, hemorragias o necrosis en tumores derivados de ratones inyectados, con solución salina. El tratamiento con Anexina V solamente no alteró la morfología de los tumores.

De conformidad con otros datos presentados en la presente memoria, 40 µg de coaguligando anti-VCAM-1•tTF causaron trombosis en el 70% de los vasos sanguíneos de tumores totales. La mayor parte de los vasos sanguíneos fueron ocluidos con eritrocitos empacados y coágulos, y las células tumorales se separaron unas de otras. Ambos efectos antitumora- les inducidos por el coaguligando, es decir la trombosis intravascular y los cambios en la morfología de las células tumorales, fueron suprimidos completamente por el tratamiento previo de los ratones con Anexina V.

Estos descubrimientos confirman que los efectos antitamorales de los coaguligando son mediados a través del bloqueo de la vasculatura de los tumores. Estos datos demuestran también que la FS es esencial para la trombosis inducida por el coaguligando, *in vivo*.

EJEMPLO IV

Generación de Anticuerpos para Aminofosfolípidos y Fosfolípidos Aniónicos

Este ejemplo describe un protocolo de inmunización diseñado por los inventores en vista a sus observaciones de la translocación de aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, en células endoteliales vasculares de tumores, y descubierto para que funcionara bien en la generación de anticuerpos, contra aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos. Ciertos números de anticuerpos reactivos con aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, tales como la FS y FE, fueron obtenidos. En los presentes ejemplos y en los ejemplos, siguientes, por simplicidad los anticuerpos reactivos con la FS pueden ser denominados "anticuerpos anti-FS ", aunque la unión de ciertos de estos anticuerpos no está restringido a la FS sino que se extiende a ciertos otros aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos como se muestra en la presente memoria.

A. Protocolo de Inmunización

Para presentar aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos al sistema inmune como inmunógenos más fuertes, los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos fueron formulados como células positivas a los aminofosfolípidos y células positivas a los fosfolípidos aniónicos. Los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, insertados en la membrana, rodeados por otros componentes de la membrana, tienen una mejor conformación y velocidad de eliminación para elevar los anticuerpos.

El intento consiste en inmunizar animales inmunocompetentes con células autólogas que expresen los amino- fosfolípidos y los fosfolípidos aniónicos, como se encuentran ilustrados en este caso por la FS , en donde los animales no producirían anticuerpos contra todos los antígenos de su propia superficie, pero reconocerían los fosfolí- pidos expuestos a la membrana, por ejemplola FS , como un elemento extraño. El procedimiento puede ser aplicado al uso

de cualquiera de animales de laboratorio estándares, tales como ratones BALB/c inmunocompetentes y ratas de Lewis, con cualquiera células positivas a los aminofosfolípidos o positivas a los fosfolípidos aniónicos.

Primero se seleccionaron ratones BALB/c y células de endotelioma de ratón, bEnd.3 (células endoteliales de ratón inmortalizado (cepa BALB/c)). Las bEnd.3 se cultivaron en DMEM al 10% con 9 ml/500 ml de solución tampón HEPES, en una incubadora con 10% de CO_2. Las células bEnd.3 fueron expandidas en matraces T175 TC hasta que se obtuvo el número deseado de células. Típicamente cada matraz a una confluencia aproximada de 70 a 80% tuvo aproximadamente 3 x 10^6 células, y cada ratón debía recibir de 1 x 10^6 a 20 x 10^6 células, hasta 1 x 10^7 células.

Células bEnd.3 se trataron con cantidades de 50 µM a 200 µM de peroxido de hidrógeno por un tiempo de 1o2 horas a 37°C para exponer los fosfolípidos aniónicos, tales como la FS, antes de la inmunización. La concentración de H_2O_2 es de [9.8 M]; 30% (v/v). Esta se diluye a razón de 1:1000 y luego se adicionan 0.4 ml al matraz T175 TC con 40 ml del medio hasta una concentración final de 100 µM de H_2O_2. Las células se mantuvieron durante 1 hora a 37°C. Para la recogida, las células se lavaron 3 X con PBS caliente, + EDTA 10 mM, para retirar todo el BSA o proteína del suero en el medio. Las células se retiraron con tratamiento ligero con tripsina, se lavaron y se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm. El sobrenadante se aspiró y las células volvieron a suspenderse en DMEM sin aditivos hasta el volumen apropiado (cada ratón recibe aproximadamente 1 x 10^7 células en 200 µl) y se conserva en hielo.

Las células tratadas en esta manera se inyectaron (200 µl de suspensión de células) a cada ratón por vía intraperitoneal, usando una jeringa de 1 ml y una aguja de calibre 23. Los ratones se inmunizaron de tres a siete veces a intervalos de 3 a 4 semanas. Los sueros inmunes se recogieron por sangrado de los ratones diez días después de cada refuerzo, empezando a partir del segundo refuerzo. El título del suero para la anti-FS se analizó por ELISA.

Estas inmunizaciones con células positivas a la FS, autólogas, no dio como resultado una producción no restringida de autoanticuerpos, pero estuvieron limitadas a la producción de anticuerpos reactivos con FS o reactivos con FS en combinación con otros aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos.

En otro estudio se inmunizaron ratas de Lewis hembras con células endoteliales bEnd.3 que habían sido tratadas con 200 µM de peróxido de hidrógeno durante 2 horas. El tratamiento causó la translocación de los fosfolípidos aniónicos a la superficie externa en una cantidad de 70 a 90% de las células lo cual se detectó mediante anexina V marcada con ^{125}I. Las células tratadas se lavaron, se desunieron y se contaron. Dos millones de células se suspendieron en PBS estéril y se inyectaron 5 veces por vía intraperitoneal, con el intervalo de 3 semanas entre inyecciones. El título de los anticuerpos policlonales con respecto a fosfolípidos aniónicos, se determinó 2 días después de cada inmunización.

B. Antisueros de Título Alto

Se obtuvieron ratones con títulos extremadamente altos de anticuerpos reactivos con fosfolípidos aniónicos tales como FS (Tabla 1). Los ratones no mostraron signo alguno de toxicidad. Aunque este protocolo de inmunización fue más eficaz en ratones que en ratas, globalmente, la inmunización de ratas fue eficaz y produjo el anticuerpo 9D2 (ver a continuación).

TABLA 1

Generación del Anticuerpo IgG Anti-FS	
Intervalo del Título	N^0 de ratones por Grupo (% del total)
1:100-1:1,000	2/30 (6.66%)
1:1000-1:10,000	5/30 (16.6%)
1:10,000-1:100,000	18/30 (60%)
1:100,000-1,000,000	5/30 (16.6%)

En inmunizaciones adicionales se inmunizaron varios ratones tres veces con células bEnd.3 tratadas con peróxido de hidrógeno y el suero se analizó 54 días después de la primera inmunización. Los anticuerpos IgG reactivos con FS dentro del suero se detectaron con una IgG antiratón, un anticuerpo secundario específico del Fc, y se detectaron anticuerpos IgM dentro del suero con un anticuerpo secundario específico para la mu de IgG antiratón. Se obtuvieron ciertos números de antisueros eficaces con anticuerpo IgG e IgM reactivos con la FS usando el protocolo de inmunización, del cual los antisueros con anticuerpos IgG eran generalmente más eficaces.

Estos métodos pueden usarse ahora para generar anticuerpos anti-FS particulares, adicionales, por ejemplo, que incluyan aquellos tamizados para la competencia eficaz con el anticuerpo 3G4 descrito posteriormente. Típicamente, cuando el título de IgG de los antisueros deseados para la FS alcanza un valor > 200,000, pero el título de FC es < 50,000, se puede llevar a cabo la fusión para generar el anticuerpo monoclonal.

Además, estos métodos no se encuentran limitados al tratamiento de células iniciales con H_2O_2, ya que se pueden usar otros métodos para inducir la expresión de aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos. Por ejemplo, el tratamiento con TNF y actinomicina D es otro método útil. En un caso, células bEnd.3 subconfluentes (confluencia de

aproximadamente 85%) tratadas con 10 ng/ml de TNF de ratón y 1 µg/ml de actinomicina D durante 16 horas a 37°C en la incubadora. Las células se tomaron mediante el procedimiento de inmunización mencionado anteriormente.

C. Anticuerpos Monoclonales IgG e IgM

Se obtuvieron hibridomas fusionando esplenocitos de animales inmunizados con células P3X63AG8.653 compañeras de mieloma (ATCC, Rockville, MD).

Un aspecto importante de la técnica de los inventores para preparar anticuerpos monoclonales útiles en el tratamiento de tumores es la estrategia de selección, la cual involucra el tamizado para seleccionar anticuerpos que se enlacen a aminofosfolípidos o fosfolípidos aniónicos, pero no a fosfolípidos neutros. Otro aspecto importante es seleccionar anticuerpos que se enlacen a placas recubiertas con FS en una forma tan fuerte en presencia de suero como en la ausencia de suero. Esto se lleva a cabo para excluir anticuerpos que reconozcan complejos de la FS y proteínas del suero, que se creen causan o contribuyen al síndrome antifosfolípido.

La estrategia para aislar anticuerpos monoclonales que reaccionan con la FS , por ejemploinvolucró el tamizado de sobrenadantes de hibridoma sobre placas recubiertas con FS , usando un anticuerpo secundario específico Fc gama de IgG antiratón. El tamizado se llevó primero a cabo contra cuatro fosfolípidos (FS, fosfatidilserina; FE, fosfatidiletanolamina; CL, cardiolipina; y FC, fosfatidilcolina), así como células bEnd.3. Los clones reactivos con el fosfolípido neutro FC fueron desechados, al igual que los clones que no eran reactivos con células bEnd.3. Se seleccionaron clones anti- FS de alta unión. Los pocillos que tenían reactividad sólo por la FS o una fuerte preferencia por la FS fueron primero subclonados y los pocillos que exhibieron reactividad por la FS en combinación con la unión con otros fosfolípidos aniónicos lo fueron en segundo lugar.

En ciertos de los siguientes estudios, también se incluyeron anticuerpo IgM monoclonales de ratón, denominados 3SB, D11 y BA3, producidos como lo describe Rote *et al.*, (1993). El anticuerpo 3SB se describe en la bibliografía como un anticuerpo anti-FS y el anticuerpo D11 se describe en la bibliografía como un anticuerpo anticardiolipina (anti-CL). Detalles de la generación y caracterización de estos anticuerpos fueron descritos por Rote *et al.*, (1993).

El isotipo de cada hibridoma seleccionado, generado por los inventores fue determinado. Como los anticuerpos de la clase IgG tienen numerosas ventajas sobre los IgM, incluyendo típicamente mayor afinidad, menor velocidad de eliminación *in vivo* y simplicidad de su purificación, modificación y manipulación, se deseo particularmente su generación. Para enfocarse en pocillos con el isotipo IgG homogéneo, los pocillos que contenían IgM o una mezcla de diferentes Igs fueron descartados o se volvieron a clonar. La subclonación de clones altamente positivos se repitió de 3 a 4 veces.

El isotipo de anticuerpos IgG e IgM, representativos, determinado mediante ELISA, se presenta en la Tabla 2. Los inventores denominaron inicialmente al anticuerpo 3G4 como "F3-G4" antes de cambiar la designación a 3G4. Esto no refleja cambio alguno en el material biológico. La dependencia o independencia del suero de los anticuerpos se presenta también en la Tabla 2.

TABLA 2

Isotipo y Dependencia del Suero de los Anticuerpos Anti-FS		
Nombre	Origen	Especie/Isotipo
3SB	Rote et al., 1993	IgM Kappa de ratón
D11	N. Rote	IgM Kappa de ratón
BA3	Rote et al., 1993	IgM Kappa de ratón
9D2	Este estudio	IgM Kappa de rata
1B12	Este estudio	IgG_1 Kappa de ratón
3G4	Este estudio	IgG_3 Kappa de ratón
1B9	Este estudio	IgG_1 Kappa de ratón
3B10	Este estudio	IgG_3 Kappa de ratón
2G7	Este estudio	IgG_1 Kappa de ratón
7C5	Este estudio	IgG_1 Kappa de ratón

D. Protocolo de ELISA y Caracterización de Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos fueron estudiados adicionalmente mediante ELISA y comparado con el 3SB y D11. El ELISA anti- FS usado en los presentes estudios se lleva a cabo de la siguiente manera. Al menos que se especifiquen diferencias particulares, este es el formato del ELISA usado en todos los estudios de la presente solicitud.

El ELISA se ilustra usando el antígeno FS (P-6641, 25 mg, 10/mg/ml (el solvente es Cloroformo: MeOH, 95:5) en una botella de 2.5 ml). Se pueden usar otros fosfolípidos usando el mismo protocolo. La solución concentrada de FS (u

otros fosfolípidos) deberá ser extraída en alícuotas y almacenada en un envase hermético a -30°C. Las placas de 96 pocillos, preferidas, son la Immulon 1 de fondo en U, de Dynatech (de Dynatech Labs, Cat# 011-0103550).

La solución de tampón de bloqueo, estándar, usada en la presente memoria es 10% de suero de bovino disuelto en PBS. Otras soluciones de bloqueo son apropiadas pero deberá excluirse cualquier detergente de las soluciones de bloqueo y de lavado. El anticuerpo primario es la muestra o mezcla de prueba. El anticuerpo secundario preferido es el IgG- HRP antiratón de cabra. Las soluciones de desarrollo son: 10 ml de 0.2 M Na_2PO_4, 10 ml de ácido cítrico 0.1 M, una comprimido de 10 mg de OPD, y 10 µl de peróxido de hidrógeno. La solución de detención es H_2SO_4 0.18 M.

El protocolo comprende cubrir la placa de 96 pocillos con FS de la siguiente manera: diluir la solución concentrada de FS en n-hexano hasta 10 µg/ml y mezclar bien. Añadir 50 µl a cada pocillo y permitir que éste se evapore durante una hora. Añadir a cada pocillo 200 µl de suero al 10% (u otra solución de tampón de bloqueo), cubrir y conservar a temperatura ambiente durante 2 horas o durante una noche a 4°C. Lavar la placa tres veces con PBS. Añadir el anticuerpo primario (diluir en solución tampón de bloqueo) e incubar durante 2 horas a 37°C. Lavar tres veces con PBS. Añadir 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario (típicamente anti-IgG de ratón, de cabra, conjugado con HRP u otro anticuerpo secundario, apropiado) e incubar durante 1 hora a 37°C. Lavar la placa tres veces con PBS. Revelar el ELISA añadiendo 100 µl de solución reveladora a cada uno de los pocillos, revelar durante 10 minutos, después añadir a cada placa 100 µl de solución de detención y leer la.D.O. a 490 nm.

Los siguientes resultados se presentan para el 9D2, 1B12, 3G4 y 1B9. La afinidad de estos anticuerpos por la FS se determinó y SE comparó con la del 3SB. Determinadas afinidades relativas de los anticuerpos se mejoran más en comparación con el 3SB (Tabla 3).

TABLA 3

Afinidad Relativa de Anticuerpos Anti-FS				
Nombre	CE_{50}(µg/ml)[1]	Unión contra 3SB (veces de Incremento)	CE_{50} (nM)[2]	Afinidad contra 3SB (veces de incremento)
3SB	0,468	1	0,518	1
D11	>40,0	0,011	>44,4	0,011
9D2	0,104	4,50	0,115	4,50
1B12	0,312	1,50	2,07	0,25
3G4	0,040	11,7	0,266	1,94
1B9	0,019	24,6	0,126	4,11
Anexina V[3]	0,100	4,68	2,77	0,18

[1]En base a diluciones de sobrenadantes de Cultivo de Tejidos; la concentraciones de IgG e IgM se determinaron por ELISA de tipo sándwich usando los Ig anti-ratón o anti-rata como anticuerpos de captura. Todos los clones segregan en promedio de 10 a 15 pg/ml de Ig.
[2] PM peso molecular usado para la conversión: IgM - 900 kDa, IgG - 150 kDa, Anexina V - 36 kDa
[3]La afinidad de la Anexina V por la FS se encuentra en el intervalo de 0,1 nM a 1 nM. El valor en esta Tabla representa la unión de la Anexina V tratada con biotina, comercial, detectada mediante estreptavidina-HRP usando las condiciones de ELISA que para los anticuerpos anti-FS

La especificidad de los anticuerpos se determinó por ELISA usando placas cubiertas con los siguientes fosfolípidos: FS; fosfatidilserina; FE, fosfatidiletanolamina; FI, fosfatidilinositol; AF, ácido fosfatídico; FG, fosfatidilglicerol; FC, fosfatidilcolina; CL, cardiolipina; y EM, esfingomielina. Los perfiles de especificidad del 9D2, 1B12, 3G4 y 1B9, en comparación con los del 3SB y D11, se presentan en la Tabla 4.

TABLA 4

Especificidad de Anticuerpos Anti-FS por Fosfolípidos	
Nombre	Intensidad Relativa de la Reactividad en ELISA[1,2]
3SB	FS = AF >> CL, FI, FE, FG
D11	CL = AF >> FS , PI, FE, FG
9D2	AF > FS = CL > FG = FI >>FE
1B12	FS = AF > CL > FE = FI, FG
3G4	FS = AF = FI = FG = CL >> FE
3B10	FS = AF = FI >> FE
1B9	FS solamente
2G7	FS solamente
7C5	FS solamente
Anexina V	FS = FE = FI = AF > CL > FG

Especificidad de Anticuerpos Anti-FS por Fosfolípidos	
Nombre	Intensidad Relativa de la Reactividad en ELISA[1,2]
[1]El símbolo > indica una diferencia al menos de 2 veces en la unión a varios fosfolípidos analizados a la misma concentración de anticuerpos [2]El símbolo >> indica una diferencia de al menos 10 veces en la unión a varios fosfolípidos analizados a la misma concentración de anticuerpos	

Los anticuerpos 1B9, 2G7 y 7C5 se comportan esencialmente igual. Estos anticuerpos reconocen sólo la FS y requieren del suero o proteína del suero para la unión a la FS. La unión del 1B9, 2G7 y 7C5 a varios fosfolípidos se ensayó únicamente en presencia de suero de bovino al 10%, mientras que la unión de otros anticuerpos se analizó ya sea en ausencia o en presencia de suero. Para anticuerpos diferentes al 1B9, 2G7 y 7C5, la presencia del suero no cambia la preferencia en la unión por un fosfolípido particular. Este último grupo, incluyendo el 3G4, 3B10 y 9D2, tiene la propiedad preferida de unión a la FS en ausencia de suero.

El anticuerpo 3SB reconoce a la FS en células intactas en presencia y en ausencia de suero. La principal reactividad del 3SB es con la FS, pero también reactividad con el ácido fosfatídico, que es un componente relativamente minoritario de la membrana plasmática (Hinkovska-Galcheva *et al.*, 1989). El 3SB se encuentra esencialmente desprovisto de reactividad con la fosfatidiletanolamina y con el fosfatidilinositol, así como con la fosfatidilcolina y la esfingomielina (Tabla 4).

La FS es el fosfolípido aniónico más abundante de la membrana plasmática y es agregado estrechamente en la laminilla interna de la membrana plasmática y células normales en condiciones normales. La FS es un aminofosfolípido. La FE es también un aminofosfolípido pero la FE es neutra, no aniónica. Además de ser un aminofosfolípido neutro, la FE se comporta de manera similar a la FS y normalmente se segrega estrechamente en la laminilla interna de la membrana plasmática.

El FI es otro fosfolípido aniónico principal de la membrana plasmática, que se segrega además estrechamente en la laminilla interna en células normales en condiciones normales. El AF y el FG son fosfolípidos aniónicos minoritarios de la membrana plasmática, que normalmente también se segregan en la laminilla interna. La CL es un fosfolípido aniónico presente en las membranas mitocondriales y típicamente no se encuentra en la membrana plasmática.

La FC y la EM son fosfolípidos neutros que contienen colina, de la membrana plasmática. Cada uno de FC y EM se encuentran localizados predominantemente sobre la laminilla externa en condiciones normales.

De acuerdo con el modelo de los inventores para la expresión diferencial de los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, entre vasos sanguíneos normales y de tumores, ninguno de los anticuerpos desarrollados usando el protocolo seleccionado reaccionó con los fosfolípidos neutros, FC y EM. El anticuerpo 1B9 fue específico para la FS, mientras que el 9D2, el 1B12 y el 3G4 se unieron a fosfolípidos aniónicos y a aminofosfolípidos, con las preferencias mostradas en la Tabla 4. El anticuerpo 9D2 se describe también en el ejemplo VI.

EJEMPLO V

La Fosfatidilserina Externalizada es un Marcador Global de Vasos Sanguíneos de Tumores

El ejemplo de la presente muestra que la exposición de la FS ocurre en células endoteliales en cada uno de diez tumores sólidos diferentes que crecen en ratones y no está limitada al modelo del tumor L540 descrito en el ejemplo II.

La FS externalizada *in vivo* se detectó inyectando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la FS por vía intravenosa en ratones que tenían varios tipos de tumores humanos o de murino. Los anticuerpos anti-FS demuestran unirse específicamente al endotelio vascular en todos los diez tumores diferentes. El endotelio vascular en órganos normales, derivado de los mismos ratones quedo sin teñir. Un anticuerpo monoclonal de control igualado con el isotipo no se localizó en la célula de tumores o en las células normales. Las células apoptóticas fueron también identificadas inmunohistoquímicamente, en donde muy pocas células endoteliales en tumores expresaron marcadores de la apoptosis.

El presente ejemplo muestra entonces que las células endoteliales vasculares en tumores, pero no en vasos normales, externalizan la FS. La mayoría de las células endoteliales de tumores, que tienen FS expuesta, fueron no apontóticas. La FS es entonces un marcador abundante y accesible de la vasculatura de tumores, que puede ser usado para la formación de imágenes y terapia de vasos en tumores.

A. Tumores L540, H358 y HT29

El anticuerpo anti-FS usado en estos estudios fue el anticuerpo IgM monoclonal de ratón denominado 3SB (Ejemplo IV, Rote *et al.*, 1993). El 3SB se une principalmente a la FS, pero también reacciona con el PA, un fosfolípido aniónico relativamente minoritario con una distribución como la de la FS. El anticuerpo anti-CL usado fue el anticuerpo IgM monoclonal de ratón denominado D11 (Ejemplo IV, Rote *et al.*, 1993).

La exposición de la FS en el endotelio vascular de tumores y normal fue examinado primero en tres modelos de tumores de animales: linfomas de Hodgkin humanos L540, carcinoma de pulmón de células no pequeñas en humanos NCI H358 (NSCLC) y carcinomas colorectales humanos HT29. Para cultivar los tumores *in vivo*, se inyectaron 2 x 10^6 células en el flanco derecho de ratones SICD y los tumores se dejaron alcanzar un diámetro de 0.8 a 1.2 cm.

Ratones que tenían tumores grandes (un volumen por arriba de 800 mm^3) recibieron una inyección intravenosa a través de la vena de la cola de 20 µg de anticuerpos bien de anti-FS o bien de anti-CL. Una hora después de la inyección los ratones fueron anestesiados y su circulación sanguínea fue perfundida con solución salina heparinizada. Los tumores y órganos normales se extirparon y se congelados para la preparación de criosecciones. La IgM de ratón fue detectada usando el conjugado IgM (µ específica)-HRP antiratón de cabra seguido del revelado con carbazol. Al menos 10 campos aleatorios por sección fueron examinados con un aumento de x40 y se calculó el porcentaje promedio de los vasos positivos.

Los anticuerpos anti-FS se alojaron específicamente en la vasculatura de todos los tres tumores (HT 29, L540 y NCI-H358) *in vivo*., como lo indicó la detección de la IgM de ratón. En este primer estudio los porcentajes promedio de vasos teñidos en los tumores fueron de 80% para el HT 29, 30% para el L540 y 50% para el NCI-H358. Los vasos en todas las regiones de los tumores fueron teñidos y hubo tinción tanto de los capilares pequeños como de los vasos más grandes.

No se observó tinción de vasos con anticuerpos anti-FS en ninguno de los tejidos normales. En el riñón, los túbulos fueron teñidos en receptores tanto anti-FS como anti-CL, y esto se refiere a la secreción de IgM a través de este órgano. Los anticuerpos anti-CL no fueron detectados en ninguno de los tumores o tejidos normales, excepto en el riñón. Estos descubrimientos indican que únicamente el endotelio del tumor expone la FS al sitio exterior de la membrana plasmática.

B. Tumores L540 Pequeños y Grandes

Para estimar el tiempo en el cual la vasculatura del tumor pierde la capacidad de segregar FS en el lado interior de la membrana, se examinó la localización anti-FS en tumores L540 cuyo volumen variaba entre 140 a 1,600 mm^3.

Los ratones fueron divididos en 3 grupos de acuerdo con su tamaño del tumor: 140-300, 350-800 y 800-1,600 mm^3. El Ab anti-FS no fue detectada en tres ratones que tenían tumores L540 pequeños (hasta 300 mm^3). El Ab anti- FS localizada en 3 animales de 5 en el grupo de tumores L540 de tamaño intermedio y todos los ratones (4 de 4) que tenían tumores L540 grandes (Tabla 5). El porcentaje de vasos sanguíneos positivos a la FS del total (identificado por marcador endotelial panorámico MECA 32) fue de 10 a 20% en el grupo intermedio L540 y de 20 a 40% en el grupo de tumores L540 grandes (Tabla 5).

TABLA 5

Externalización de FS Detectada en Tumores de Tamaño Medio y Grande		
Tamaño del Tumor (mm^3)	No. de Tumores Positivos/Total*	% de Vasos Positivos a FS/Total†
350-800	3/5	10-20
850-1,600	4/4	20-40
*Los ratones que tenían tumores L540 Cy fueron divididos en tres grupos de acuerdo con el tamaño del tumor. 20 µg de anticuerpos anti-FS fueron inyectados i.v. y se les dejó circular durante 1 hora. Los anticuerpos de ratón fueron detectados en secciones congeladas usando conjugado de anti-IgM de ratón-peroxidasa. †El número total de vasos sanguíneos se determinó usando Ab panendotelial MECA 32. Los vasos positivos a la FS y positivos al Meca fueron contados en 4 campos por sección transversal del tumor. Se presenta el intervalo de % de vasos positivos a FS dentro del mismo grupo.		

C. Tumores L540, HT29, Colo26, B16 y 3LL

Usando los anticuerpos anti-FS (3SB) y anti-CL (D11), se examinó la exposición a la FS en el tumor y endotelio vascular normal, en estudios adicionales usando modelos de tumores en tres animales adicionales (seis en total): linfomas de Hodgkin humanos L540, carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano NCI H358 (NSCLC), carcinomas colorectales humanos HT29, carcinomas de colon de ratón Colo26, melanomas de ratón B16 y tumores de pulmones de ratón 3LL.
En estos estudios, los tumores se cultivaron por vía subcutánea en ratones SCID y se les dejó alcanzar un volumen de 0.4-0.7 cm^3. Se usaron tres o más ratones por grupo. Se inyectaron anticuerpos IgM de ratón anti-FS o anti-CL (30µg/ratón) por vía intravenosa en 200 µl de solución Salina. Treinta minutos después los ratones se sacrificaron, se extrajo su sangre y su circulación sanguínea se perfundió con solución salina heparinizada. Se extrajeron los órganos principales y los tumores y se congelaron para la preparación de criosecciones. La IgM de ratón se detectó usando conjugado IgM (µ específica)-HRP antiratón de cabra seguido por el revelado con carbazol.

Secciones en serie de tumores fueron teñidas con un anticuerpo monoclonal, MECA 32, dirigido contra un marcador panendotelial de vasos de ratón. Los vasos positivos a la FS fueron identificados morfológicamente y por su teñido

coincidente con IgM antiratón y MECA 32. Al menos 10 campos aleatorios por sección (0.317 mm^2/campo) fueron examinados en forma ciega por dos observadores independientes. Se calculó el porcentaje de vasos positivos al MECA 32, que se tiñeron positivamente para la FS. Se examinaron tres tumores de cada tipo en cada uno de dos estudios separados. Se calcularon los valores medios y los errores típicos (ET). La variación entre tumores en el número de vasos totales y positivos a la FS, en cada grupo, fue de aproximadamente 10%.

Los seis tumores de este estudio contenían vasos positivos a la FS (Tabla 6). La detección de la FS por el 3SB fue específica ya que no se observó tinción del endotelio del tumor con el anticuerpo anti-CL (Tabla 6; fig. 1). No se observó localización vascular de anticuerpos anti-FS o anti-CL en órganos normales diferentes a los riñones (la tinción del túbulo en receptores tanto anti-FS y anti-CL refleja la secreción de IgM a través de este órgano).

TABLA 6

Localización Específica de Anticuerpos Anti-FS en Vasos de Tumores		
Tejido	Anti-FS *	Anti-CL
Tumor L540	19.3 ±3.3	0
Tumor H358	15.6 ±4.1	0
Tumor HT29	4.2 ± 1.6	0
Tumor B16	40.6 ± 5.4	0
Tumor 3LL	5.3 ±3.7	0
Tumor Colo 26	12.4 ±2.4	0
Adrenal	0	0
Cerebro	0	0
Corazón	0	0
Riñón	0†	0†
Intestino	0	0
Hígado	0	0
Pulmón	0	0
Páncreas	0	0
Bazo	0	0
Testículo	0	0
*Los resultados se presentan como el % promedio (± ET) de vasos positivos a la FS de vasos teñidos MECA 32 por campo de 0,317 mm^2. Se analizaron seis tumores de cada tipo. El número promedio de vasos positivos a MECA 32 por campo de 0,317 mm^2 fue de 25, 21, 17, 18, 27 y 22 ± 10% de vasos para los tumores L540, H358, HT29, B16, 3LL y Colo 26, respectivamente. † La tinción tubular específica no antigénica fue visible en receptores tanto anti-FS como anti-CL.		

En estos estudios el porcentaje de vasos positivos a la FS varió de 10% en tumores Colo 26 hasta 40% en tumores B16. La IgM anti-FS estuvo presente en la superficie luminal de capilares y vénulas en todas las regiones de los tumores. Los vasos positivos a la FS parecieron ser particularmente prevalecientes en y alrededor de regiones de necrosis. Los vasos positivos usualmente no mostraron anormalidades morfológicas que fueron aparentes mediante el microscopio óptico. Vasos ocasionales localizados en áreas necróticas mostraron signos morfológicos de deterioro. El anticuerpo anti-FS (pero no el anticuerpo anti-CL) también se localizó en células de tumores necróticos y apoptóticos.

Estos estudios controlados demostraron que la FS es expuesta regularmente sobre la superficie luminal del endotelio vascular en varios tumores, pero en tejidos normales, y que la expresión de la vasculatura del tumor no es específica para el modelo.

D. La Mayor Parte de los Vasos de Tumores Positivos a la FS no son Apoptóticos

Se usó una técnica de doble marcado para identificar células endoteliales apoptóticas en secciones de tumores. Las células endoteliales fueron identificadas con el marcador de células pan-endotelial, el MECA 32. Las células apoptóticas fueron identificadas inmunohistoquímicamente usando dos marcadores independientes: una forma activa de caspasa-3, que identifica cambios citosólicos en células moribundas (Krajewska *et al.*, 1997) y ADN fragmentado, que identifica células que tienen alteraciones nucleares (Gavrieli *et al.*, 1992).

La caspasa-3 activa fue detectada por un anticuerpo específico anticaspasa-3 de conejo (R&D), Minneapolis, MN) seguido de la incubación de conjugado de IgG anticonejo a la fosfatasa alcalina (AP, Pierce, Rockford, IL). Otras secciones de tumores fueron analizadas por el ensayo de Túnel (ApopTAg^{MR} Kit, Oncor, MD) usando el conjugado de antidigoxigeninafosfatasa alcalina como un reactivo de detección. Las secciones fueron doblemente teñidas para los marcadores de apoptosis (rosa) y para el marcador de células endoteliales, MECA 32 (café). Ambos colores fueron claramente visibles en las mismas células, si los marcadores de células endoteliales y células apoptóticas coincidían.

Células endoteliales en cinco de seis tipos de tumores (HT29, H358, B16, Colo 26, L540) no exhibieron ninguno de los marcadores de apoptosis (Tabla 7). El sexto tipo de tumor, el 3LL, exhibió unas pocas células endoteliales apoptóticas que fueron localizadas en áreas necróticas. En cambio, las células malignas apoptóticas fueron comunes en todos los

tipos de tumores. El porcentaje de células de tumores apoptóticas varió de 1 a 2% en tumores L540 a valores de 12.6 a 19.6% en tumores 3LL.

TABLA 7

Expresión de Marcadores Apoptóticos en Tumores				
	Caspasa-3 Activa		Ensayo de Túnel	
Tipo de Tumor	Células de Tumores (% del total)'	Vasos de Tumores	Células de Tumores (% del total)'	Vasos de Tumores
3LL	19.8 ±4.3	< 1.0[1]	12.6 ±3.6	0
HT29	13.7 ±2.3	0	7.8 ±2.5	0
H 358	5.8 ±2.0	0	4.3 ± 1.6	0
Colo 26	5.3 ± 1.5	0	4.1 ± 1.5	0
B16	4.2 ± 1.8	0	3.5 ± 1.6	0
L540	2.3 ± 1.0	0	1.6 ±0.5	0
*El porcentaje de células de tumores o vasos sanguíneos de tumores, que fueron positivas ya sea a la caspasa-3 o al Túnel fue determinado en diez campos de alta potencia por sección. Los campos fueron seleccionados aleatoriamente a lo largo de dos direcciones perpendiculares desde los bordes hasta el centro del tumor. Se presenta el promedio (± ET) del porcentaje de células o vasos positivos en tumores de 6 ratones. †Vasos ocasionales (1 de más de 100) en el área necrótica del tumor 3LL exhibieron ambos marcadores de apoptosis				

E. Tumores MDA-MB-231 y Meth A

La exposición a la FS en el endotelio vascular de tumores fue examinada también en tumores de mama humanos MDA-MB-231 cultivándose en ratones y en fibrosarcoma Meth A de ratón cultivándose por vía subcutánea. El anticuerpo usado en estos estudios fue el anticuerpo 9D2, generado como se describió en el ejemplo IV, el cual es reactivo con fosfolípidos aniónicos.

Como se describió en detalle en el ejemplo VI, el 9D2 localizó los vasos de tumores en los tumores L540, NCI- H358 y B16, así como en modelos de tumor de mama MDA-MB-231 creciendo ortotópicamente en los panículos adiposos mamarios de fibrosarcoma de ratones SCID y Meth A de ratón creciendo por vía subcutánea. El 9D2 se localizó en vasos de tumores en todos los cinco tumores. El endotelio vascular en los tumores mostró distinto teñido de la membrana. El anticuerpo 9D2 se localizó también en la membrana y citosol de células de tumores necróticas y apoptóticas. No se observó localización vascular del anticuerpo 9D2 en 9 de los 10 órganos normales que fueron examinados, con teñido no específico de los túbulos en el riñón.

También se llevaron a cabo estudios de doble tinción en los que a los ratones que tenían tumores de mama MDA-MB-231 ortotópicos, se les inyectó epor vía intravenosa el anticuerpo 9D2 tratado con biotina y las secciones congeladas se tiñeron después con el conjugado FITC, MECA32 (Ejemplo VI). Aproximadamente el 40% de los vasos positivos al MECA 32 uniron al 9D2.

F. Tumores MD-MBA-435

En un modelo de cáncer de mama adicional, la exposición a la FS en el endotelio vascular del tumor fue examinado en células de cáncer de mama humano MDA-MB-435 cultivadas en ratones. El anticuerpo usado en estos estudios es una versión quimérica del anticuerpo 3G4 (ch3G4). La generación de anticuerpos 3G4 se describe en el ejemplo IV, y la producción del anticuerpo 3G4 quimérico se detalla en el ejemplo XIX. La localización del ch3G4 en el endotelio vascular de tumores en el modelo MDA-MB-435 se describe con mayor detalle en el ejemplo XIX y se muestra en la figura 22.

Brevemente los tumores fueron establecidos usándose células MD-MBA-435s y se administraron versiones tratadas con biotina del anticuerpo 3G4 quimérico y una IgG de control de especificidad irrelevante. Las secciones del tumor fueron teñidas con estreptavidina conjugada con Cy3 para detectar las proteínas tratadas con biotina. La tinción doble con el anticuerpo MECA 32 seguido por el anticuerpo secundario IgG antirata marcado con FITC se llevó a cabo para detectar el endotelio vascular. Este método de detección marcó las proteínas tratadas con biotina y el endo- telio vascular usando rojo y verde, de manera tal que las proteínas tratadas con biotina que se uneron al endotelio aparecieron amarillas en una imagen en convergencia (figura 22). Este estudio mostró la localización específica del anticuerpo 3G4 quimérico del endotelio vascular del tumor.

G. Tumores con Marcador RIP

A partir del décimo modelo, la exposición a la FS en el endotelio vascular de tumores fue examinada en un modelo de ratón transgénico "Marcador RIP" (RIP1-Marcador 2) de carcinogénesis multietapa. En este modelo de ratón transgénico, cada ratón desarrolla tumores de isletas del páncreas en un tiempo de 12 a 14 semanas de vida como

resultado de la expresión del oncogén del antígeno SV40 (Marcador) en células beta productoras de insulina. Los tumores se desarrollaron en múltiples etapas a partir de isletas hiperproliferativas, y requieren de un cambio angiogénico a fin de progresar hacia malignidad. La metaloproteinasa-9 de matriz controla el cambio angiogénico (REF).

Se llevaron a cabo estudios de localización del 9D2 en el modelo de RIP1 Marcador 2 en colaboración con el Dr. Donald McDonald, Profesor de Patología en UCSF. Se inyectó 9D2 por vía intravenosa en ratones RIP1 Marcador 2 empezando a las 10 semanas de edad, cuando todos los ratones tenían pequeños tumores sólidos altamente vascularizados. Se llevó a cabo la doble tinción de secciones gruesas del tumor (80 µm) para identificar 9D2 y CD31 localizados en tumores y páncreas normal. Aproximadamente el 50% de vasos (positivos al CD31) en tumores pancreáticos habían localizado el 9D2, mientras que los vasos en las isletas normales no fueron teñidos. Los ratones inyectados con la IgM de rata de control tenían un teñido débil e infrecuente de los vasos del tumor. También fue evidente cierta fuga de 9D2 e IgM de rata de control hacia tejidos extravasculares y más allá del endotelio.

El presente ejemplo confirma por tanto que las células endoteliales vasculares en tumores externalizan la FS y fosfolípidos aniónicos a su superficie luminal, en donde pueden ser enlazados por anticuerpos anti-FS *in vivo*. La FS se encuentra ausente de la superficie externa de células endoteliales vasculares en tejidos normales, indicando que los anticuerpos reconocedores de FS, anexina V y otros ligandos pueden ser usados para suministrar fármacos citotaxicos, coagulantes y radionúclidos para la formación de imágenes o destrucción, selectivas, de vasos en tumores sólidos.

El endotelio de tumor positivo a la FS pareció, para la mayor parte, ser viable en los tumores usados en este estudio. No exhibe marcadores de apoptosis, se encuentra morfológicamente intacto y metabólicamente activo, tal como lo indica su expresión de la VCAM-1, E-selectina y otras proteínas de rápido reemplazo. Aunque a menudo se considera como un indicador de apoptosis, la exposición de la FS ha sido observada en varios tipos de células viables, incluyendo células malignas (Rao, *et al.*, 1992), (Utsugi *et al.*, 1991) plaquetas activadas (Rote *et al.*, 1993), y trofoblastos embrionarios en varias etapas de migración, invasión de la matriz y fusión (Adler *et al.*, 1995).

La falta de correlación entre la exposición a la FS y confinamiento a la muerte celular ha sido también demostrada en células de linfoma B preapoptóticas que reestablecen la asimetría de la FS y crecen normalmente después de retirar el estímulo pro-apoptótico (Hammill *et al.*, 1999). En células viables, normales, la exposición a la FS es desencadenada probablemente por sucesos superficiales, tales como interacciones, ligando-receptor, que inducen flujos de Ca^{2+} en las células (Dillon *et al.*, 2000). Los flujos de Ca^{2}+ activan la escramblasa (Zhao *et al.*, 1998) e inhiben simultáneamente la aminofosfolípido translocasa (Comfurius *et al.*, 1990).

La FS en vasos de tumores es atractiva como un objetivo para terapia o formación de imágenes de cáncer por varias razones: es abundante (aproximadamente 3×10^6 moléculas por célula); se encuentra sobre la superficie luminal del endotelio de tumores, a la cual se tiene acceso directamente para la unión por agentes de localización dirigida vascular en la sangre; se encuentra presente en un alto porcentaje de las células endoteliales de tumores en diversos tumores sólidos, y se encuentra ausente del endotelio en todos los tejidos normales examinados hasta la fecha. Los anticuerpos no conjugados, agentes de localización dirigida vascular y agentes para la formación de imágenes dirigidas contra la FS en la vasculatura de tumores pueden ser usados entonces para la detección y tratamiento del cáncer en el hombre.

EJEMPLO VI

Los Fosfolípidos Aniónicos son Expuestos sobre la Superficie de los Vasos Sanguíneos de Tumores

Los fosfolípidos aniónicos se encuentran ausentes en gran medida de la laminilla externa de la membrana plasmática de células de mamífero en condiciones normales. La exposición de la fosfatidilserina, por ejemplosobre la superficie celular ocurre durante la apoptosis, necrosis, daño celular, activación celular y transformación maligna. El presente ejemplo muestra que los fosfolípidos aniónicos son regulados ascendentemente sobre la vasculatura de los tumores *in vivo*, como queda demostrado por la localización tanto del anticuerpo específico como de un ligando natural que se une a fosfolípidos aniónicos.

Un anticuerpo monoclonal, el 9D2, que reconoce específicamente fosfolípidos aniónicos, fue inyectado en ratones que tenían una variedad de tumores ortotópicos o ectópicos. Otros ratones recibieron anexina V, un ligando natural que se une a fosfolípidos aniónicos. Tanto el 9D2 como la anexina V se localizaron específicamente en el endotelio vascular en todos los tumores y también en células tumorales en y alrededor de regiones de necrosis. Entre 15 y 40% de las células endoteliales en vasos de tumores fueron teñidas. No se detectó localización en el endotelio normal.

Varios factores y condiciones asociadas con tumores conocidas por estar presentes en un microambiente de tumores, fueron examinados con respecto a su capacidad para causar exposición de los fosfolípidos aniónicos en células endoteliales cultivadas, lo cual es juzgado por la unión del 9D2 y de la anexina V. La hipoxia/reoxigenación, acidez, trombina y citocinas inflamatorias indujeron todas, la exposición de los fosfolípidos aniónicos. El peróxido de hidrógeno fue también un inductor fuerte. El tratamiento combinado con citocinas inflamatorias, hipoxia/reoxigenación tuvo

efectos mayores que efectos aditivos. La exposición demostrada de los fosfolípidos aniónicos en el endotelio de tumores *in vivo* es causada entonces probablemente por el daño y activación por parte de las citocinas y especies de oxígeno reactivo. Sin importar el mecanismo, los fosfolípidos aniónicos son marcadores de vasos tumorales que pueden ser usados ahora para la localización dirigida de vasos de tumores, formación de imágenes y terapia.

A. Materiales y Métodos

1. Materiales

Se obtuvo Na^{125} I de Amersham (Arlington Heights, IL). Medios de cultivo de tejidos de Eagle modificado de Dulbecco y PBS de Dulbecco que contenía Ca^{2}+ y Mg^{2}+ se obtuvieron de Gibco (Grand Island, NY). Suero de ternera fetal se obtuvo de Hyclone (Logan, Utah). La L-a-fosfatidilserina, L-a-fosfatidilcolina, cardiolipina, L-α-fosfatidiletanolamina, L-α-fosfatidilinositol, esfingomielina, ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, O-fenilenediamina, peróxido de hidrógeno y trombina fueron de Sigma (St. Louis, MO). Placas de fondo plano con 24 pocillos fueron obtenidas de Falcon (Becton Dickinson y Co., Lincoln Park, NJ).

El factor de crecimiento con hepatocitos recombinantes (HGF o factor de dispersión) y actinomicina D fueron de Calbiochem (San Diego, CA). Interleucina-1 alfa, beta de murino recombinante y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) fueron comprados de R&D Systems (Minneapolis, MN). Interferón de Tipo Universal I (proteína híbrida que sustituye todos los tipos de interferones) fue comprado de PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, NJ). El factor del crecimiento endotelial vascular humano recombinante 121 (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas humano BB, la interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-10 (IL-10) y el factor del crecimiento de fibroblastos humano 2 (FGF-2) fueron comprados de PeproTech (Rocky Hill, NJ).

2. Anticuerpos

El anticuerpo de células endoteliales de pan-ratón MECA 32 fue obtenido del Dr. E. Butcher (Stanford University, CA) y sirvió como un control positivo para estudios inmunoistoquímicos. Detalles de este anticuerpo han sido publicados (Leppink *et al.*, 1989). Inmunoglobulina antirata de conejo, inmunoglobulina antiratón de rata y anticuerpos secundarios antiratón y antirata de cabra, conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP) fueron comprados ya sea de Daco (Carpintería, CA) o de Jackson Immunoresearch Labs (West Grove, PA).

El anticuerpo 9D2 usado en estos estudios fue generado como se describió en el ejemplo IV. El 9D2 es un anticuerpo monoclonal de rata reactivo con fosfolípidos aniónicos. La caracterización adicional de la especificidad del fosfolípido del 9D2 se proporciona en la sección de resultados de este ejemplo.

3. Células

Células de linfoma de Hodgkin L540Cy, derivadas de un paciente con enfermedad en etapa terminal, fueron proporcionadas por el Profesor V. Diehl (Koln, Alemania). El carcinoma de pulmón de células no pequeñas humanas NCI-H358 fue proporcionado por el Dr. Adi Gazdar (Southwestern Medical Center, Dallas, TX). El fibrosarcoma de ratón Meth A y el carcinoma de mama humano MDA-MB-231 fueron obtenidos de American Type Cell Collection (Rockville, MD). La línea de endotelioma de cerebro humano, bEnd.3, fue proporcionada por el Profesor Werner Risau (Max Plank Institution, Munich, Alemania) y fue mantenida en DMEM con FBS al 10%. Las células endoteliales aórticas de bovino adulto (ABAE) fueron compradas de Clonetics (San Diego, CA; Walkerville, MD). Las células ABAE fueron mantenidas en DMEM con 10% de suero y 2 ng/ml de bFGF.

4. Cultivo de Tejidos

Células bEnd.3, ABAE y todas las células de tumores excepto el linfoma L540Cy fueron mantenidas en DMEM complementado con suero de ternero fetal al 10%, 2 mM L-glutamina, 2 unidades/ml de penicilina G y 2 µg/ml de estreptomicina. Las células L540Cy fueron mantenidas en RPMI 1640 que contenía los mismos aditivos. Las células fueron subcultivadas por una semana. El tratamiento con tripsina de las células bEnd.3 se llevó a cabo usando 0.125% de tripsina en PBS que contenía 0.2% de EDTA. Para estudios *in vitro*, las células endoteliales fueron sembradas con una densidad de 10 x 10^{3} células/ml en 1 ml de medio de cultivo en placas de 24 pocillos y se incubaron de 48 a 96 horas antes de ser usadas en los ensayos. El medio se renovó 24 horas antes de cada estudio.

5. Reactividad con fosfolípidos Inmobilizados en Plástico

Se disolvieron fosfolípidos en n-hexano a una concentración de 50 µg/ml. Se añadieron 100 µl de esta solución a pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de la evaporación del solvente en el aire, las placas se bloquearon durante 2 horas con suero de bovino fetal al 10% diluido en DPBS que contenía Ca^{2+} 2 mM (solución tampón de unión).

Anticuerpo 9D2 o anexina V fueron diluidos en la solución tampón de unión en presencia de 10% de suero a una concentración inicial de 6.7 nM. Diluciones de dos veces en serie fueron preparadas en las placas (100 µl por pocillo).

Las placas fueron incubadas después por 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y el 9D2 y anexina V fueron detectados mediante conjugado IgM antirata de cabra a HRP y anexina V antihumana de conejo seguido de conjugado de IgG de anticonejo de cabra a HRP (todos diluidos en relación 1:1000), respectivamente. Se detectaron reactivos secundarios usando un substrato cromogénico OPD seguido de la lectura de las placas a 490 nm usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Palo Alto, CA).

La especificidad de la unión del anticuerpo 9D2 fue validada usando IgM de rata de control de especificidad irrelevante (Pharmingen, San Diego, CA). La especificidad de la unión de la anexina V a fosfolípidos, la cual es dependiente del Ca^{2+}, fue determinada diluyendo el reactivo en el DPBS que contenía EDTA 5 mM. Los controles negativos adicionales consistieron del lavado de las placas con la solución tampón de unión que contenía 0.2% de un detergente Tween 20. Este tratamiento extrae lípidos, eliminando así el fosfolípido que se absorbió en el plástico. Ni el anticuerpo 9D2 ni la anexina V se unieron a las placas lavadas con detergente.

6. Detección de Fosfolípidos Aniónicos sobre Superficies de Células Endoteliales Cultivadas

Células endoteliales fueron cultivadas hasta que alcanzaron aproximadamente 70% de confluencia. Para inducir la exposición a la FS, las células fueron tratadas con H_2O_2 (200 µM durante 1 hora a 37°C. Los portaobjetos de control y tratados fueron lavados con DPBS que contenía Ca^{2}+ y Mg^{2}+ y fijados con 0.25% de glutaraldehído diluido en la misma solución tampón. Los grupos aldehído en exceso fueron enfriados súbitamente por incubación con 50 mM de NH_4Cl durante 5 minutos. Para examinar el efecto de los detergentes y solventes orgánicos en la detección de los fosfolípidos, algunos portaobjetos fueron preincubados con acetona (5 minutos) o con PBS que contenía 1% (v/v) de Triton^{MR} X-100.

Las células fueron lavadas con DPBS (que contenía Ca^{2}+, Mg^{2}+ y 0.2% (p/v) de gelatina) y se incubaron con 1 µg/ml de anexina V tratada con biotina (Pharmingen, San Diego, CA) o con 1 µg/ml de anticuerpo 9D2. Después de 2 horas de incubación las células fueron lavadas con 0.2% de solución tampón de gelatina y fueron incubadas con estreptavidina-HRP (dilución de 1:500). IgM de rata de especificidad irrelevante y estreptavidina sola fueron usadas como controles negativos en estos estudios. Todas los etapas fueron realizados a temperatura ambiente. La actividad de la HRP fue medida adicionando O-fenilendiamina (0.5 mg/ml) y peróxido de hidrógeno (0.03% p/v) en solución tampón de citrato-fosfato, pH 5.5. Después de 15 minutos se transfirieron 100 µ! de sobrenadante a placas de 96 pocillos, 100 µl de $H_2 SO_4$ 0.18 M fueron adicionados y la absorbancia se midió a 490 nm. Alternativamente las células positivas a la FS fueron detectadas por adición de substrato carbazol, dando por resultado un precipitado insoluble de color rojo parduzco. Cada estudio se llevó a cabo por duplicado y se repitió al menos dos veces.

7. Inhibición de la unión del 9D2 y Anexina V a Fosfolípidos por Liposomas

La especificidad del reconocimiento de fosfolípidos fue confirmada adicionalmente por ensayos de competencia por varios liposomas. Los liposomas se prepararon a partir de soluciones de 5 mg de un solo fosfolípido en cloroformo. Las soluciones se secaron con nitrógeno para formar una delgada capa en un matraz de vidrio de fondo redondo. Después se añadieron diez ml de solución tampón Tris (0,1 M, pH 7,4) y el matraz se sometió a ultrasonidos cinco veces durante 2 minutos. El 9D2 o la anexina V (6,66 nM) se preincubaron con 200 µg/ml de solución liposomal durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se añadió a placas cubiertas con fosfolípidos o a monocapas de células endoteliales. Se determinó la capacidad del 9D2 para unirse a un fosfolípido inmovilizado o superficie celular, en presencia o ausencia de diferentes liposomas, como se describió anteriormente.

8. Competencia del 9D2 y de la Anexina V por la unión a la FS Inmovilizada

El anticuerpo 9D2 y la anexina V tratados con biotina se prepararon incubando proteínas purificadas con un exceso molar 10 veces de N-hidroxisuccinimida biotina (Sigma, MO) durante 1 hora a temperatura ambiente. La biotina libre se eliminó mediante diálisis contra PBS. El procedimiento de marcación con biotina no dañó la capacidad de unión a la FS de cualquier proteína. Para estudios de competencia, las proteínas no modificadas y tratadas con biotina fueron premezcladas con un exceso molar de 10 veces de proteínas no modificadas. Las mezclas fueron adicionadas después a placas recubiertas con FS. Los reactivos unidos se detectaron mediante el conjugado de estreptavidina-HRP diluido a razón de 1:1000. La unión a la FS de cada reactivo en ausencia de un competidor se tomó como el valor del 100%.

9. Crecimiento de Tumores Implantados Por vía subcutánea

Para estudios de localización, 2 x 10^7 células de linfoma de Hodgkin humanas L540 o 1 x 10^7 células de otros tipos de tumor, fueron inyectadas por vía subcutánea al flanco derecho de ratones SCID (Charles River, Wilmington, MA). Los tumores se dejaron alcanzar un volumen de 0.4 a 0.7 cm^3. Se usó un mínimo de tres animales por grupo. Los estudios fueron replicados al menos tres veces.

10. Modelo Ortotópico de Carcinoma de Mama MDA-MB-231 Humano

Ratones nu/nu o SICD hembras, fueron comprados en Charles River. Células de carcinoma mamario humano MDA-MB-231 fueron implantadas en el panículo adiposo mamario de acuerdo con un protocolo publicado (Price, 1996). Brevemente los ratones fueron anestesiados y se realizó una incisión de 5 mm en la piel sobre el tórax lateral. El panículo adiposo mamario fue expuesto para asegurar el sitio correcto para la inyección de 1 x 10^7 células MDA-MB-231 resuspendidas en 0.1 ml de solución salina.

11. Detección de Fosfolípidos Aniónicos en Ratones que tenían Tumores In Vivo

Las técnicas inmunohistoquímicas, en las cuales el 9D2 o anexina V se aplican directamente a secciones de tejidos congelados, no discriminan entre fosfolípidos aniónicos sobre la laminilla interior y la laminilla exterior de la membrana plasmática. Para detectar fosfolípidos ubicados externamente, los métodos se llevaran a cabo esencialmente como se describió previamente (Ejemplo V; Ran *et al.*, 1998). Ratones SCID que tenían tumores fueron inyectados por vía intravenosa ya sea con 50 µg de anticuerpo 9D2 o anticuerpo 9D2 tratado con biotina, o 100 µg de anexina V tratada con biotina. Sesenta minutos después los ratones fueron sacrificados y la sangre de su circulación fue extraída y fueron perfundidos con solución salina heparinizada como se describió previamente (Burrows *et al.*, 1992). Todos los órganos principales y tumores se extrajeron y se congelaron para la preparación de las criosecciones.

Las secciones fueron bloqueadas con PBS que contenía 10% de suero. Para prevenir la pérdida de fosfolípidos durante el proceso de corte, los detergentes y solventes orgánicos fueron omitidos de las soluciones tampón y lavado. La IgM de rata fue detectada usando conjugados de IgM antirata de cabra (µ específica)-HRP, seguido del revelado con carbazol o DAB (Fries *et al.*, 1993). Los reactivos tratados con biotina fueron detectados por la estreptavidina conjugada a HRP.

Secciones de tumores derivadas de ratones inyectados con solución salina o IgM de rata de especificidad irrelevante sirvieron como controles negativos. Controles adicionales consistieron de la incubación de los portaobjetos en solución de Tritón el 1% o en acetona por 10 minutos. Estos tratamientos extraen fosfolípidos. No se detectó señal en estas condiciones. El número de vasos positivos por campo de alto poder fue determinado con un aumento de x 100. Al menos 10 campos por sección fueron examinados y se calculó el porcentaje promedio de vasos positivos. La tinción de las secciones mediante este método para la presencia de 9D2 o anexina V detecta células que tienen fosfolípidos aniónicos externalizados a los que se logró acceso por unión mediante los reactivos *in vivo*.

12. Identificación y Cuantificación de Vasos de Tumores Positivos a la FS

Estructuras con anticuerpo 9D2 localizado o anexina V fueron identificadas como vasos sanguíneos por la aparición morfológica en secciones teñidas con DAB y por la tinción coincidente con el marcador de células panendotelial, MECA 32 sobre secciones en serie de tejidos congelados. La cuantificación en secciones teñidas con DBA fue realizada contando vasos teñidos por MECA 32, 9D2 o anexina V en secciones en serie de un tumor. Seis portaobjetos de cada tipo de tumor derivados de 6 ratones inyectados con el anticuerpo 9D2, IgM de rata de control o anexina V, fueron examinados. Al menos 10 campos aleatorios por sección (0.317 mm^2/campo) fueron calificados en forma ciega por dos observadores independientes. Los números promedio y errores estándares de vasos teñidos por el 9D2, anexina V o MECA 32 fueron calculados. El número promedio de vasos positivos al 9D2oanexina V, determinados en cada grupo de tipo de tumor, se comparó con el número promedio de vasos positivos al MECA 32 en el mismo grupo de tumores. El porcentaje de vasos positivos al 9D2 anexina V fue calculado.

En estudios adicionales, ratones que tenían MDA-MB-231 (con un volumen de 0.3 a 0.7 cm^3) fueron inyectados por vía intravenosa con 50 µg de 9D2 marcado con biotina, IgM de control o anexina V (seis ratones por grupo). Los reactivos tratados con biotina fueron incubados primero con el conjugado de estreptavidina-Cy3, se lavaron en PBS, luego se incubaron con anticuerpo MECA 32 seguido de anticuerpo secundario de IgG antirata marcado con FITC. Imágenes individuales, tomadas con filtros apropiados para la fluorescencia del Cy3 (rojo) y FITC (verde), fueron capturados por una cámara digital y transferidos a una computadora. Las imágenes de 10 campos aleatorios (0.317 mm^2/campo) que mostraron un color amarillo (un producto de fluorescencia combinada de verde y rojo) fueron superpuestos con la ayuda del software Metaview. El mismo método se usó para analizar tumores de ratones inyectados con la IgM de rata de control o con solución salina. El porcentaje de vasos con 9D2 o anexina V, localizado, se calculó de la siguiente manera: número promedio de vasos en amarillo por campo, dividido entre el número promedio de vasos en verde (total) multiplicado por 100.

B. Resultados

1. Especificidad del Anticuerpo 9D2 y Anexina V por el Fosfolípido

El anticuerpo 9D2 reconoció específicamente los fosfolípidos aniónicos (FS, AF, CL, FI, FG) y no tuvo reactividad significativa con fosfolípido neutro (FE, FC y EM) en ELISA (figura 2A; Tabla 8). El orden de la intensidad de la unión del 9D2 a los fosfolípidos en el ELISA fue AF>FS=CL>FG=FI. La unión fue específica de antígeno dado que no se observó unión con varias IgM de rata de control de especificidad irrelevante. La unión del 9D2 a cualquiera de los fosfolípidos aniónicos adsorbidos a las placas de ELISA se bloqueó por liposomas preparados a partir de cualquiera de los fosfolípidos aniónicos, pero no por liposomas preparados a partir de algunos de los fosfolípidos neutros.

TABLA 8

Especificidad del 9D2 y Anexina V por Fosfolípidos				
Fosfolípido		Abundancia y ubicación en la membrana plasmática en condiciones normales[3]	CE_{50} de unión (pM)	
Nombre	Tipo		902	Anexina V
FS	Amino-PL aniónico	PL principal (15%), localizado en el lado interno	12	100
AF	PL aniónico	PL minoritario (menor que 1%)	2	100
FG	PL aniónico	PL minoritario (menor que 1%)	100	250
FI	PL aniónico	PL mayoritario (7%), localizado principalmente en el lado interno	100	50
CL	PL aniónico	Ausente de la membrana plasmática	15	130
FE	Amino-PL neutro	PL mayoritario (22%), localizado principalmente en el lado interno	>8000	100
EM	Colina-PL neutro	PL mayoritario (9%), localizado en el lado externo	>8000	>8000
FC	Colina-PL neutro	PL mayoritario (46%), localizado sobre el lado externo	>8000	>8000
[a] Porcentaje de fosfolípidos totales, tomado de Fridrikkson, *et al.*, 1999. Los porcentajes pueden variar para diferentes tipos de células.				

La anexina V se unió también a fosfolípidos aniónicos pero su unión fue menos específica que la del 9D2 porque se unió también fuertemente al fosfolípido neutro, la FE. El orden de la intensidad de unión de la anexina V a los fosfolípidos en ELISA fue FI>FS =FE=PA= CL>FG (Tabla 8). Estos descubrimientos para la anexina V son consistentes con datos anteriores (Andree *et al.* 1990).

La unión del 9D2 permaneció sin ser afectada por la presencia de EDTA 5 mM, mostrando que no requería de Ca^{2+} para la unión a fosfolípidos aniónicos. En cambio, la unión de la anexina V a fosfolípidos aniónicos fue suprimida en presencia de EDTA 5 mM, como se espera a partir de su dependencia conocida en el Ca^{2}+ por la unión a fosfolípidos aniónicos o FE (Schlaepfer *et al.*, 1987; Blackwood y Ernst, 1990).

Ni 9D2 ni la anexina V se unieron a placas de ELISA que habían sido recubiertas con fosfolípidos pero que habían sido lavadas después con 0.2% de Tween en solución salina, confirmando que su unión fue a los fosfolípidos absorbidos. El 9D2 y la anexina V no se uniron detectablemente a la heparina, al sulfato de heparano o a ADN de hélice doble o sencilla.

2. El Anticuerpo 9D2 y la Anexina V no se Bloquean en Forma Cruzada, Mutuamente, en la unión a la FS

Para examinar si el anticuerpo 9D2 y la anexina V compiten por la unión a la FS, se llevaron a cabo estudios de bloqueo cruzado usando proteínas tratadas con biotina sobre placas recubiertas con FS. La unión del anticuerpo 9D2 tratado con biotina y anexina V fue bloqueada por un exceso molar de 10 veces del 9D2 no modificado y anexina V, respectivamente (Tabla 9). Sin embargo, la anexina V no modificada no afectó la capacidad del 9D2 tratado con biotina para unirse a la placa de FS. De igual manera la adición del anticuerpo 9D2 no modificado no altero la capacidad de la anexina V tratada con biotina, a la unión a la placa de FS (Tabla 9).

TABLA 9

El 9D2 y la Anexina V no Bloquean en Forma Cruzada la unión a la FS		
Proteína de unión a la FS	Competidor [a]	Unión (% del Control)[b]
Anexina V tratada con biotina	Anexina V	8%
9D2 tratado con biotina	Anexina V	93%
Anexina V tratada con biotina	9D2	95%
9D2 tratado con biotina	9D2	5%
[a]La anexina V o el anticuerpo 9D2 fueron premezclados en un exceso molar de 10 veces con respecto a los reactivos tratados con biotina. La unión de reactivos tratados con biotina, a la FS , sobre placas de microtitulación, fue detectado por estreptavidina-HRP [b]La reactividad de reactivos tratados con biotina, en la ausencia de un competidor, fue tomada como el 100%. Se presentan los valores promedio de determinaciones por triplicado. La DT fue menor que el 10% del valor promedio.		

Estos resultados indican que el anticuerpo 9D2 y la anexina V no bloquean en forma cruzada, una con otra, la unión a placas recubiertas con FS, ya sea porque reconocen diferentes epítopes sobre la molécula de FS o diferentes conformaciones de la FS absorbida sobre plástico.

3. Unión a Fosfolípidos Aniónicos Externalizados sobre Superficies de Células

Se examinó la unión del anticuerpo 9D2 y anexina V a superficies celulares usando células de endotelioma bEnd.3 de ratón o células ABAE de bovino. Ni el 9D2 ni la anexina V se unieron a monocapas no permeabilizadas de ningún tipo de célula en condiciones inactivas. Esto indica que la mayoría de los fosfolípidos aniónicos de la membrana plasmática son normalmente secuestrados al dominio citosólico. En cambio, se observó un fuerte teñido cuando las células fueron preincubadas con TNFα y actinomicina D en condiciones que causaron apoptosis en una cantidad de 90 a 100% de las células endoteliales.

Para confirmar que el 9D2 y la anexina V se unieron a fosfolípidos sobre superficies celulares, células bEnd.3 tratadas con H_2O_2 fueron incubadas con anticuerpo 9D2 o anexina V en presencia o ausencia de varios liposomas competidores. Los fosfolípidos aniónicos quedaron expuestos sobre células bEnd.3 viables, no apoptóticas, cuando se pretrataron con una concentración inferior a la tóxica (100-200 μM de H_2O_2 (Ran *et al.*, 2002).

La unión del anticuerpo 9D2 a células bEnd.3 tratadas con H_2O_2 se inhibió por liposomas que contenían fosfolípidos aniónicos pero no por liposomas que contenían fosfolípidos neutros (figura 3). La magnitud de la inhibición de la unión del 9D2 a células varió en el orden AF>FS>CL>FG>FI, en estrecho acuerdo con los resultados obtenidos usando fosfolípidos inmovilizados en plástico (figura 2A y figura 2B). De manera similar, la unión de la anexina V a células tratadas con H_2O_2 se bloqueó por liposomas que contenían FS, AF, FE, CL y en un menor grado, FI y FG. Los liposomas que contenían EM o FC no bloquearon la unión de la anexina V con las células, todo de acuerdo con los resultados obtenidos usando fosfolípidos inmovilizados por plástico.

Estos resultados confirman que el 9D2 se une a fosfolípidos aniónicos en las células endoteliales tratadas con H_2O_2, mientras que la anexina V se une a la FE además de a fosfolípidos aniónicos.

4. Detección de Fosfolípidos Aniónicos Externalizados en Células In Vivo

Las técnicas inmunohistoquímicas directas, en el que el 9D2 o anexina V se aplican directamente a secciones de tejidos congelados, no discriminan entre fosfolípidos aniónicos sobre la laminilla interior y la laminilla exterior de la membrana plasmática. Para detectar fosfolípidos ubicados externamente, fueron inyectados 9D2 y anexina V, por vía intravenosa, en ratones que tenían tumores y la localización en los vasos de tumores fue determinada por inmunohistoquímica indirecta.

Ratones que tenían varios tipos de tumores sólidos fueron inyectados por vía intravenosa con el anticuerpo 9D2 o anexina V tratada con biotina, y una hora después se desangraron y los tumores y tejidos normales se extirparon y se prepararon secciones congeladas. Las secciones congeladas de tejidos se cortaron y se tiñeron con IgM antirata marcada con HRP o con estreptavidina marcada con HRP, para determinar a qué células se había unido la anexina V después de la inyección. Los vasos sanguíneos se identificaron morfológicamente, y a partir de su tinción positiva por el anticuerpo de la célula panendotelial, MECA 32, en secciones en serie.

5. Biodistribución del Anticuerpo 9D2 y Anexina V en Ratones que tenían Tumores

El anticuerpo 9D2 y la anexina V fueron localizados en vasos de tumores en todos los cinco tumores incluidos en este estudio (Figura 4; Tabla 10). Los tumores fueron: tumor de mama MDA-MB-231 humano con crecimiento ortotópico en los panículos adiposos mamarios de ratones SCID; tumor de Hodgkin L540 humano de crecimiento subcutáneo: NCI-H358 NSCLC humano de crecimiento subcutáneo; melanoma B16 de ratón de crecimiento subcutáneo y fibrosarcoma Meth A de ratón de crecimiento subcutáneo.

TABLA 10

Localización Específica de 9D2 y Anexina V en Vasos de Tumores			
Tejido	Anticuerpo 9D2[a]	Control IgM de Rata	Anexina V[b]
Tumores			
MDA-MB-231	40.6 ± 5.4	-	45.3 ± 5.6
L540cy	19.3 ±3.3	-	16.7 ±3.9
NCI-H358	15.6 ±4.1	-	ND
B16	23.4 ± 4.5	-	21.3 ±6.6
MethA	25.7 ±6.8	-	ND
Normal			
Adrenal	-	-	-
Cerebro	-	-	-
Corazón	-	-	-
Riñón	-[c]	-[c]	-
Intestino	-	-	-
Hígado	-	-	-
Pulmón	-	-	-
Páncreas	-	-	-
Bazo	-	-	-
Testículo	-	-	-

[a]La localización del anticuerpo 9D2 y control de IgM de rata en ratones que tenían tumores se determinó por inyección del anticuerpo (50 µg), perfundiendo la circulación sanguínea de los ratones con solución salina y detectando el anticuerpo sobre secciones de los tejidos, usando un conjugado de anti-IgM de ratón - peroxídasa. Los resultados se presentan como el porcentaje promedio (± ET) de vasos positivos a la FS de vasos teñidos con MECA 32 por campo de 0.317 mm^2. Se analizaron seis muestras de cada tipo. El número promedio de vasos positivos al MECA 32, por campo de 0.317 mm^2 fue de 23, 25, 21, 18 y 19± 10 vasos por tumores MDA-MB-231, L540cy, H358, B16yMeth A, respectivamente.
[b]La localización de la anexina V fue determinada inyectando anexina V tratada con biotina, seguido de la detección en secciones congeladas usando conjugado de estreptavídinaperoxidasa. °Tinción tubular específica, no antigénica, fue visible en ambos receptores de anticuerpos 9D2 y de control.

El 9D2 y la anexina V proporcionaron esencialmente los mismos patrones de teñido. La localización del anticuerpo 9D2 en los vasos de tumores fue específica dado que no se observó teñido del endotelio de los tumores, con IgM de rata de especificidad irrelevante. Supuestamente, la fuga de la IgM de rata de control hacia afuera de los vasos de los tumores, ocurrió en cierto grado, pero la tinción de la IgM extravascular fue demasiado difusa o demasiado débil para discernirlo mediante inmunohistoquímica indirecta.

No se observó localización vascular del anticuerpo 9D2 o anexina V en nueve de diez órganos normales que fueron examinados (Tabla 10). En el riñón se observó tinción de los túbulos no pareció ser específico al antígeno. Los túbulos fueron teñidos en ambos receptores de 9D2 e IgM de rata de control, supuestamente por la secreción de IgM o sus metabolitos a través de este órgano. Los ovarios, un sitio de la angiogénesis fisiológica, no fueron examinados.

El porcentaje de vasos positivos a la 9D2 y anexina V varió desde 40% en tumores MDA-MB-231 hasta 15% en tumores H358. Los vasos positivos a fosfolípidos aniónicos estuvieron presentes sobre la superficie luminal de capilares y vasos en todas las regiones de los tumores pero fueron particularmente prevalecientes en y alrededor de regiones de necrosis. La mayoría de los vasos positivos o fosfolípidos aniónicos no mostraron anormalidades morfológicas que fueron evidentes mediante el microscopio óptico. Vasos ocasionales, particularmente aquellos localizados en áreas necróticas, mostraron signos morfológicos de deterioro. El anticuerpo 9D2 y la anexina V se localizaron también en células tumorales necróticas y apoptóticas mientras que la localización de la IgM de control no fue detectable (Fig. 4).

Estos descubrimientos demuestran que los fosfolípidos aniónicos se encuentran presentes sobre la superficie luminal de células endoteliales vasculares en varios tumores pero no en tejidos normales.

6. Estudios de Doble Tinción

También se llevaron a cabo estudios de doble tinción en los que ratones que tenían tumores de mama MDA-MB- 231, ortotópicos, fueron inyectados por vía intravenosa con anticuerpo 9D2 tratado con biotina, IgM de control tratada con biotina o anexina V tratada con biotina. Una hora después los ratones se desangraron y sus tumores se extirparon y se cortaron secciones congeladas. Las secciones de tumores se tiñeron después con estreptavidina conjugada a Cy3, para detectar las proteínas tratadas con biotina y con MECA 32 conjugado a FITC, para detectar el endotelio vascular. Este método de detección marcó las proteínas tratadas con biotina y el endotelio vascular, en rojo y verde. Cuando las proteínas tratadas con biotina se unieron al endotelio, la imagen de convergencia apareció de color amarillo.

En estos estudios, el 9D2 y la anexina V, tratados con biotina, aparecieron principalmente enlazados al endotelio vascular, porque sus patrones de tinción convergieron con el del MECA 32. Aproximadamente el 40% de los vasos positivos al MECA 32 se unieron al 9D2 y a la anexina V, en estrecho acuerdo con los resultados obtenidos mediante la inmunohistoquímica indirecta. Sin embargo, la fuga de proteínas tratadas con biotina, hacia el intersticio del tumor, fue detectada por doble tinción, mientras que no fue evidente por inmunohistoquímica indirecta.

Proteínas tratadas con biotina fueron visibles afuera del endotelio vascular, alrededor de una minoría (aproximadamente de 5%) de vasos. En tumores de ratones que habían sido inyectados con IgM de rata tratada con biotina, de especificidad irrelevante, la IgM tratada con biotina se había fugado también hacia el intersticio del tumor alrededor de un porcentaje similar (aproximadamente de 5%) de vasos, pero principalmente pareció no estar unida por el endotelio vascular. Supuestamente la detección de 9D2 y anexina V, extravaciados, por la técnica de doble tinción, pero no por la técnica de inmunohistoquímica indirecta, refleja la mayor sensibilidad de la técnica precedente y de la mayor precisión con la cual se pueden comparar dos patrones de tinción. Los tumores de control no inyectados quedaron completamente sin teñir por la estreptavidina-Cy3, indicando que la fluorescencia roja corresponde a una proteína localizada.

EJEMPLO VII

Translocación de la Membrana de Fosfolípido Aniónico en un Ambiente de Tumor

El descubrimiento de los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos como marcadores de superficie *in vivo*, únicos para las células endoteliales vasculares de tumores, incitaron a los inventores a investigar más el efecto de un microambiente de tumor en la translocación y expresión de la membrana exterior de esas moléculas. El presente ejemplo muestra que la exposición de las células endoteliales *in vitro* 1, a ciertas condiciones que se asemejen a aquellas en un tumor, duplica la expresión superficial de aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, observada anteriormente, en células viables intactas.

A. Materiales y Métodos

1. Yodación de la Anexina V

La anexina V humana, recombinante, fue purificada a partir de E. coli transformada con plásmido fosfolípido ET12a-Paniónico (obtenido del Dr J. Tait, Universidad de Washington, Seattle). La pureza de la proteína y la unión a la FS se confirmaron sobre SDS-PAGE y sobre plástico recubierto con FS, respectivamente. Se usaron anticuerpos antianexina V, purificados por afinidad, policlonales, de conejo, para detectar la anexina V unida a la FS. La anexina V se radiomarcó con ^{125}I usando Cloramina T como lo describe Bocci (1964). La actividad específica fue de aproximadamente 1 x 10^6 cpm por µg de proteína, medida a través de un ensayo de Bradford (1976).

2. Tratamiento de Células Endoteliales

Células endoteliales fueron tratadas con citocinas o con factores de crecimiento a las concentraciones indicadas en la Tabla 11. Todos los reactivos fueron diluidos en un medio que contenía 10% de suero y fueron incubados con las células a 37°C durante 24 horas.

Para estudiar el efecto de la hipoxía, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos y fueron incubadas en una atmósfera normóxica humidificada (21% de O_2, 5% de CO_2) por 48 horas antes de ser transferidas a una atmósfera hipóxica humidificada (1% de O_2, 5% de CO_2, 94% de N_2) en una cámara sellada (Billups Rothenberg Inc., Del Mar, Ca). Las células fueron incubadas en una cámara hipóxica durante 24 horas a 37°C y fueron regresadas después a un ambiente normóxico por 4 horas a 37°C. Las células se compararon con un cultivo paralelo de una misma etapa, sembradas el mismo día y mantenidas en condiciones totalmente normóxicas. En algunos estudios se añadieron IL-1α (10 mg/ml) y TNFα (20 ng/ml) al medio antes de la transferencia de la cámara hipóxica.

Para examinar el efecto de un microambiente de ácido, las células se expusieron al medio de crecimiento que carecía de bicarbonato, el cual se ajustó a diferentes valores de pH (que variaban entre 7,3 y 6,2) con la cantidad requerida de HCl. Las células fueron incubadas a 37°C en la ausencia de CO_2. Se confirmó que los medios de cultivo mantuvieron el pH asignado durante el período de 24 horas de cultivo. Estas condiciones experimentales no fueron tóxicas para las células endoteliales tanto de bovino como de ratón y no afectaron la morfología de las células o la viabilidad de la monocapa unida.

3. Detección de FS de Células Endoteliales Cultivadas, por Anexina V marcada con ^{125}I

Después del tratamiento con los reactivos descritos anteriormente, las células tratadas y de control fueron incubadas con 7.1 pmoles de anexina V marcada con ^{125}I (200 µl/pocillo) en la solución tampón de unión. Después de la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente las células se lavaron extensivamente y se disolvieron en 0,5 M de NaOH. El volumen total de 0,5 ml se transfirió a tubos de plástico y se realizó el recuento en un contador gama. No se

determinó unión específica en presencia de EDTA 5 mM y se restó de los valores experimentales. Los resultados se expresaron como pmoles netos de anexina V unida a las células, normalizadas por 1 x 10^6 células.

La unión máxima de la anexina V se determinó en células tratadas simultáneamente con actinomicina D y TNFα (50 ng/ml de cada componente). Como se había descrito anteriormente, estos agentes causan apoptosis y exposición a la FS en 90-100% de células endoteliales (Lucas *et al.*, 1998). La unión basal de la ^{125}I-anexina V a células no tratadas se determinó en presencia del medio con suero al 10%. La cantidad de ^{125}I-anexina V que se unió a los cultivos no tratados se restó de los cultivos tratados. La exposición de la FS se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: anexina V unida a las células (pmoles) en condiciones experimentales, dividida entre la unión máximo de la Anexina V (pmoles), multiplicado por 100. Cada estudio se realizó por duplicado y se llevó a cabo al menos tres veces. Se calcularon valores promedio. El ET de los valores promedio de tres experimentos distintos fue menor que 5%.

B. Resultados

1. Inducción por H_2O_2

Se sembraron células endoteliales bEnd.3 de ratón a una densidad inicial de 50,000 células/pocillo. Veinticuatro horas después las células se incubaron con concentraciones crecientes de H_2O_2 (de 10 μM a 500 μM) durante 1 hora a 37°C o se dejaron sin tratar. Al final de la incubación las células se lavaron 3 veces con PBS que contenía gelatina al 0,2% y se fijaron con glutaraldehido al 0,25%. Los mismos pocillos se tiñeron con IgM anti-FS o se trataron con tripsina y se evaluó la viabilidad mediante la prueba de exclusión de azul de tripano. Para la tinción anti-FS, después del bloqueo con gelatina al 2% durante 10 minutos, las células se incubaron con 2 μg/ml de anticuerpo anti-FS, seguido de la detección con conjugado de IgM antiratón-HRP.

La exposición de las células endoteliales al H_2O_2, a elevadas concentraciones, causa la translocación de la FS en aproximadamente el 90% de las células. Sin embargo esto está acompañado por la desunión de las células del substrato y la viabilidad de las células se reduce hasta aproximadamente 50-60%. La asociación de la expresión de la FS superficial con una reducción en la viabilidad de las células no es comprensible aunque es todavía interesante por notar que aproximadamente el 90% de la translocación de la FS se observa únicamente con una reducción de 50 a 60% en la viabilidad de las células.

El uso de menores concentraciones de H_2O_2 dio por resultado una expresión significativa de la FS sin una reducción apreciable en la viabilidad de las células. Por ejemplo, se detectó FS en la superficie de las células de aproximadamente el 50% de las células en todos los pocillos tratados con H_2O_2, usando H_2O_2 a concentraciones tan bajas como de 20 μM. Es importante observar que en estas bajas concentraciones de H_2O_2, las células permanecieron firmemente unidas al plástico y entre sí, no mostraron cambios morfológicos y no tenían signos de citotoxidad. Análisis detallados revelaron esencialmente un 100% de contacto célula-célula, conservación de la forma apropiada de las células y un citoesqueleto intacto.

El 50% de la expresión superficial de la FS , inducida por bajos niveles de H_2O_2, fue observada entonces en poblaciones de células en las que la viabilidad de las células fue idéntica a la del control, las células sin tratar (es decir, 95%). La expresión de la FS asociada con altas concentraciones de H_2O_2 estuvo acompañada por daño celular, y las células positivas a la FS expuestas a altas concentraciones de H_2O_2 fueron desunidas, flotaron y tenían citoesqueletos rotos.

El mantenimiento de la viabilidad celular en presencia de bajas concentraciones de H_2O_2 es consistente con datos de otros laboratorios. Por ejemplo, Schorer *et al.*, (1985) mostró que las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) tratadas con 15 μM de H_2O_2 promediaron una viabilidad de 90 a 95% (descrita como un daño de 5% a 10%), mientras que aquellas expuestas a 1500 μM de H_2O_2 fueron sólo 0%-50% viables (de 50% a 100% de daño).

El uso de H_2O_2 para simular el ambiente del tumor *in vitro* es apropiado también porque el ambiente del tumor es rico en células inflamatorias, tales como macrófagos, PMNs y granulocitos, que producen H_2O_2 y otras especies de oxígeno reactivo. Aunque nunca antes fueron relacionadas con marcadores vasculares de tumores, estables, se sabe que las células inflamatorias median el daño a las células endoteliales mediante mecanismos que involucran la especie de oxígeno reactivo que requiere de la presencia de H_2O_2 (Weiss *et al.*, 1981; Yamada *et al.*, 1981; Schorer *et al.*, 1985). De hecho, estudios han demostrado que la estimulación de PMNs *in vitro* produce concentraciones de H_2O_2 suficientes para causar daño celular endotelial, subletal, sin causar la muerte celular (medida mediante ensayo de liberación de cromo) o desunión celular; y que estas concentraciones de H_2O_2 se pueden conseguir localmente *in vivo* (Schorer *et al.*, 1985).

Los presentes datos de translocación *in vitro* se correlacionaron con los resultados previos que muestran que los anticuerpos anti-FS se localizan específicamente en células endoteliales vasculares de tumores, *in vivo*, y que no se unen a células en tejidos normales. El descubrimiento de concentraciones de H_2O_2 similares a las concentraciones *in vivo*, inducen la translocación de la FS en la superficie de las células endoteliales, sin romper la integridad de la célula, tiene importantes implicaciones además de validar los datos *in vivo* originales y los enfoques terapéuticos de los inventores.

Se sabe que las células endoteliales de humano, bovino y murino, son negativas a la FS en condiciones normales. Cualquier expresión de la FS, previamente documentada, ha sido asociada siempre con daño celular y/o muerte celular. Este no es el caso en los presentes estudios, en los que se mantiene la viabilidad normal. Esto muestra que la translocación de la FS en el endotelio vascular de tumores es mediada por mecanismos bioquímicos no relacionados con el daño celular. Se cree que esta es la primera demostración de la expresión superficial de la FS en células endoteliales morfológicamente intactas y el primer indicio de que la expresión de la FS puede ser desconectada de la(s) ruta(s) de la apoptosis. Regresando a la funcionalidad de la presente invención, estas observaciones confirman nuevamente que la FS es un marcador sostenible, en vez que transitorio, de los vasos sanguíneos de tumores y un candidato apropiado para la intervención terapéutica.

2. Inducción Mediante Trombina

Se observó también que la trombina incrementa la expresión de la FS, aunque no en el mismo grado que el H_2O_2. Estos datos son también una parte integral del modelo de inducción de tumores de la expresión de la FS desarrollado por los inventores de la presente: la expresión superficial de la FS, inducida por la trombina, en tejidos normales, produciría también coagulación adicional ya que la expresión de la FS coordina el ensamblaje de complejos para el inicio de la coagulación.

Se sabe que el ambiente de los tumores es protrombótico, de manera tal que la vasculatura del tumor se encuentra predispuesta a la coagulación (patente US No 5,877,289). Como la trombina es un producto de la cascada de la coagulación, se encuentra presente en la vasculatura del tumor. De hecho, la presencia de la trombina induce la expresión de la VCAM, contribuyendo a la capacidad de los inventores para explotar la VCAM como un marcador para ser dirigido a la vasculatura del tumor (patentes US Nos 5,855,866; 5,877,289). Los presentes datos, que muestran que la trombina induce también la expresión de la FS, son entonces tanto relevantes para la localización dirigida de aminofosfolípidos con anticuerpos desnudos y con conjugados terapéuticos, y explica además los efectos beneficiosos del Factor Tisular que contiene el coaguligando anti-VCAM (Ejemplo I).

3. Otros Agentes de Estrés Oxidativo

Células bEnd.3 de ratón o ABAE de bovino, *in vitro*, fueron tratadas durante 24 horas con varias concentraciones de factores y condiciones que se encuentran presentes en el microambiente de muchos tumores (Lichtenbeld *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1996), tales como la hipoxia/reoxigenación, trombina, acidez, citocinas inflamatorias y peróxido de hidrógeno (Tabla 11).

La externalización de la FS y fosfolípidos aniónicos fue cuantificada midiendo la unión de la ^{125}I-anexina V. La cantidad de la unión de la anexina V fue comparada con el de las células en las que la apoptosis de 90-100% de células había sido inducida mediante el tratamiento combinado con actinomicina D y TNF-α. La actinomicina D y TNF-α indujeron la unión de 6.2 pmoles de anexina V por 10^6 células (3.8×10^6 moléculas de anexina V por células) sobre ambos tipos de células, en buena concordancia con los reportes de la bibliografía (Rao *et al.*, 1992). Este valor fue tomado como el nivel máximo de fosfolípidos aniónicos externalizados.

TABLA 11

Inducción de FS Recreando el Ambiente de Tumores			
Tratamiento	Concentración	^{125}I-anexina V (% de Unión Máx.)	
		Células ABAE	Células bEnd.3
Medio con 10% de suero	N/A	0	0
Actinomicina D +TNFα	50 ng/ml cada uno	100	100
VEGF	20 ng/ml	0	0
FGF-2	20 ng/ml	0	0
Factor de dispersión	40 ng/ml	0	0
TGF βı	20 ng/ml	0	0
PDGF-BB	20 ng/ml	0	0
IL-10	20 ng/ml	0	0
IL-8	20 ng/ml	0	0
IL-6	20 ng/ml	0	0
IL-la	10 ng/ml	6,4	7,5
IL-1 β	10 ng/ml	5,8	5,5
Interferón	40 ng/ml	8,6	2,8
TNFα	20 ng/ml	7,4	13,7
Trombina	50 nM	8,8	17,4
Hipoxia	1 % de O_2	de 15,0 a 17,5	22,5
Hipoxia + IL-la	Igual que arriba	26,0	31,0
Hipoxia + TNFα	Igual que arriba	33,0	36,0

pH 6.6	N/A	20,2	18,9
Peróxido de hidrógeno	200 µM	95,5	98,4

En la Tabla 11, las concentraciones de citocinas, factores de crecimiento y trombina, usadas, se seleccionaron de valores de la bibliografía para que tuvieran un efecto estimulante máximo en células endoteliales cultivadas. Estas concentraciones no causaron toxicidad en un período de la prueba (24 horas) juzgado por la apariencia morfológica, una falta de desunión, y una falta de captación del azul de tripano. La concentración de H_2O_2 empleada fue la concentración máxima que no causó citotoxicidad en las condiciones seleccionadas.

La unión basal de la ^{125}I-anexina V fue determinado en presencia del medio de crecimiento únicamente. La exposición máxima a la FS fue determinada después de la inducción de la apoptosis mediante el tratamiento combinado con la actinomicina D y TNF α. Se presenta el promedio de duplicados de tres estudios separados. El error estándar fue menor que 5%.

Las células no tratadas estuvieron desprovistas en gran medida de FS externalizada, lo cual fue juzgado por el enlazamiento de la anexina V o del anticuerpo anti-FS (9D2) (Tabla 11). La unión basal en presencia del medio de crecimiento sólo fue de 0.44 y 0.68 pmoles de ^{125}I-anexina V para células ABAE y bEnd.3, respectivamente. Esto corresponde a aproximadamente el 7,1% y el 10,9% de la unión para las células ABAE y bEnd.3, respectivamente, lo cual se correlacionó bien con el descubrimiento de que aproximadamente el 10% de las células se unieron a la anexina V tratada con biotina, en las mismas condiciones.

El VEGF, HGF, FGF TGFβ_1, PDGF, IL-6, IL-8 y IL-10 no incrementaron la unión de la ^{125}I-anexina V por arriba del nivel basal para células no tratadas. Los mediadores inflamatorios (IL-1α, IL-1S, TNFα e interferon) causaron un incremento pequeño, pero reproducible, en la FS y en la translocación del fosfolípido aniónico que varió de 5 a 8% del nivel máximo para las células ABAE y del 3 al 14% para las células bEnd.3.

La hipoxia/reoxigenación, trombina o condiciones externas ácidas (pH 6.8-6.6) indujeron una externalización moderadamente alta de la FS y del fosfolípido aniónico, que varió de 8 a 20% del nivel máximo para células ABAE y de 17 a 22% del nivel máximo para células bEnd.3. El incremento más grande en la FS y en la translocación del fosfolípido aniónico fue observado después del tratamiento con una cantidad de 100 a 200 µM de peróxido de hidrógeno. Este tratamiento causó una externalización casi completa (95%) de FS en ambos tipos de células lo cual fue juzgado por la unión de la ^{125}I-anexina V (Tabla 11). Más del 70% de las células ABAE y bEnd.3 se uniron a la anexina V tratada con biotina, lo cual fue juzgado inmunohistoquímicamente.

Células endoteliales en las que se generó la translocación de la FS y del fosfolípido aniónico, mediante el tratamiento con hipoxia/reoxigenación, trombina, acidez, TNFα,IL-1 o H_2O_2 permanecieron unidas a la matriz durante el período del ensayo (24 horas), conservaron el contacto célula-célula y conservaron su capacidad para excluir el colorante azul de tripano. La orientación normal de FS y del fosfolípido aniónico fue reestablecida de 24 a 48 horas después, en la mayoría de las células, después de retirar el factor de inducción, o las condiciones del cultivo se regresaron a las condiciones normales. Estos resultados indican que el estrés oxidativo suave, creado por la aplicación directa de H_2O_2 o indirectamente por la hipoxia/reoxigenación, acidez, trombina, o citocinas inflamatorias, desencadena una translocación transitoria de la FS y fosfolípidos aniónicos en células endoteliales viables.

4. Efectos Combinados de Citocinas Inflamatorias e Hipoxia/Reoxigenación

Una exposición aumentada de FS y fosfolípido aniónico se observó cuando las células ABAE y bEnd.3 fueron sometidas a hipoxia/reoxigenación en presencia de IL-1α o TNFα. En la ausencia de las citocinas, la hipoxia/reexigenación incrementó la exposición a la FS por las células ABAE hasta una cantidad de 15% a 17.5% del nivel máximo para células tratadas con concentraciones apoptóticas de actinomicina D y TNFα. En presencia de concentraciones subtóxicas de IL-1α o TNFα, la hipoxia/reoxigenación incrementó la exposición del fosfolípido aniónico hasta 26% y 33% respectivamente del máximo (Figura 5; Tabla 11). La comparación con el efecto de las citocinas en la ausencia de hipoxia/reoxigenación indica que la combinación de citocinas e hipoxia/reoxigenación tuvo efectos mayores que aditivos en la exposición a la FS. Efectos similares fueron observados en las células bEnd.3.

Por lo tanto, en el ambiente del tumor, la exposición de FS y fosfolípidos aniónicos inducida por hipoxia/reoxigena- ción puede ser amplificada por citocinas inflamatorias y posiblemente por otros estímulos tales como acidez y trotbina.

Estos estudios *in vitro* arrojan luz con respecto al mecanismo de la exposición de la FS en células endoteliales de tumores *in vivo*. Muestran que varios factores inducen la exposición de FS en células endoteliales sin causar citotoxicidad, lo cual simula la situación en tumores *in vivo*. La hipoxia seguido de reoxigenación, acidez, y trombina incrementaron al máximo la exposición de FS en células endoteliales viables. Las citocinas inflamatorias (TNFα e IL-1α) causaron también una débil pero definida inducción de la exposición a la FS.

Estas condiciones son probablemente los estímulos de inducción principales en tumores *in vivo* porque: i) el endo- telio positivo a la FS prevalece en y alrededor de regiones de necrosis donde se observan comúnmente la hipoxia, acidez, vasos sanguíneos que han sufrido trombosis, y leucocitos huésped de infiltración; ii) el descubrimiento de que la

hipoxia/reoxigenación amplifica la débil actividad de exposición a la FS del TNFα e IL-1 en células endoteliales *in vitro* se correlaciona con la situación *in vivo* en tumores donde la hipoxia y tumor que secreta citocina y células huésped existen conjuntamente; iii) se ha descrito que la hipoxia/reoxigenación y trombina generan especies de oxígeno reactivo (ROS) en células endoteliales mediante la activación de la enzima de la membrana similar a la NADPH oxidasa (Zulueta *et al.*, 1995). La ROS producida por células malignas podría contribuir al daño de las células endoteliales (Shaughnessy *et al.*, 1989). El peróxido de hidrógeno fue el inductor más poderoso de la exposición de FS en células endoteliales cultivadas encontradas en el presente estudio, proporcionando un soporte indirecto para el involucramiento de la ROS.

La FS externalizada proporciona una superficie de fosfolípido negativa en la cual se concentran y se ensamblan los factores de coagulación. Esto puede contribuir al estado procoagulante sobre el endotelio del tumor que ha sido reconocido desde hace mucho tiempo. La FS proporciona también un sitio de unión para macrófagos circulantes (MaEvoy *et al.*, 1986), linfocitos T (Qu *et al.*, 1996) y células polimorfonucleares que ayudan a la infiltración de los leucocitos en tumores. La adherencia de macrófagos activados, células polimorfonucleares y plaquetas a la FS, sobre el endotelio del tumor, puede conducir a secreción adicional de la especie de oxígeno reactivo y a la amplificación adicional de la exposición a la FS.

EJEMPLO VIII (ejemplo de referencia)

Efectos Antitumorales de Conjugados de Anexina

El sorprendente descubrimiento de que los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos son marcadores estables de la vasculatura de tumores, significa que se pueden usar construcciones de anticuerpo-agente terapéutico, en el tratamiento contra el cáncer. Además de usar anticuerpos como agentes para localización dirigida, las anexinas y otras proteínas de unión específico pueden ser usadas también para suministrar específicamente agentes terapéuticos a la vasculatura de tumores. Los siguientes datos muestran los efectos antitumorales que resultan de la administración *in vivo* de construcciones de anexina-TF.

A. Métodos

Se preparó y administró un conjugado de anexina V-fTF a ratones nu/nu con tumores sólidos. Los tumores se formaron a partir de células de carcinoma colorectal HT29 humano que formaban tumores de aproximadamente 1.2 cm^3. El coaguligando de anexina V-tTF (10 µg) fue administrado por vía intravenosa y se le dejó circular durante 24 horas. Los ratones tratados con solución salina se mantuvieron en forma separada como animales de control. Después de un día de tratamiento, los ratones se sacrificaron se desangraron y los tumores y órganos principales se extrajeron para el análisis.

B. Resultados

Se encontró que el conjugado de anexina V-tTF induce coagulación en los vasos sanguíneos de tumores, específicos, en ratones que tienen tumores HT29. Aproximadamente el 55% de los vasos sanguíneos del tumor, en animales tratados con el conjugado de anexina V-tTF, formaron trombos seguido de una inyección individual. En cambio, hubo evidencia mínima de trombosis en la vasculatura de tumores de los animales de control.

EJEMPLO IX (ejemplo de referencia)

Efectos Antitumorales de los Anticuerpos Anti-FS 3SB

El presente ejemplo muestra los efectos antitumorales de anticuerpos anti-FS usando modelos de tumores singeneicos y xenogénicos. El anticuerpo 3SB usado en este estudio se une a la FS (y al AF), pero carece esencialmente de reactividad con la FE. Este anticuerpo anti-FS causó daño vascular en el tumor, acompañado de trotbosis y necrosis del tumor.

Los efectos de los anticuerpos anti-FS fueron examinados primero en modelos de tumores singénicos y xenogeneicos usando el anticuerpo 3SB. Para el modelo singénico, 1 x 10^7 células de carcinoma colorectal de murino, Colo 26 (obtenido del Dr. Ian Hart, ICRF, Londres) fueron inyectadas por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones BALB/c. En el modelo xenogénico, se estableció un xenoinjerto de linfoma de Hodgkin humano L540, inyectando 1 x 10^7 por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones SCID machos CB17. Los tumores se dejaron crecer hasta un tamaño de aproximadamente 0.6-0.9 cm^3 antes del tratamiento.

Los ratones que tenían tumores (4 animales por grupo) fueron inyectados por vía intraperitoneal con 20 µg de anticuerpo anti-FS, 3SB (IgM), IgM de ratón de control o solución salina. El tratamiento se repitió 3 veces con un intervalo de 48 horas. Los animales se monitorizaron diariamente para realizar mediciones del tumor y del peso corporal. El volumen del tumor se calculó como se describió en el ejemplo I. Los ratones fueron sacrificados cuando los tumores habían alcanzado 2 cm^3, o antes si los tumores mostraban signos de necrosis o ulceración.

El crecimiento de tumores tanto singénicos como xenogénicos, fue inhibido eficazmente por el tratamiento con anticuerpos anti-FS, 3SB (figura 6A y figura 6B). Los anticuerpos anti-FS causaron daño vascular al tumor, acompañado de trombosis y necrosis del tumor. La presencia de coágulos y la desintegración de la masa del tumor que rodeaba a los vasos sanguíneos bloqueados, fue evidente.

Cuantitativamente, el tratamiento con anticuerpo anti-FS, 3SB, inhibió el crecimiento del tumor hasta en 60% del volumen del tumor de control en ratones que tenían tumores grandes Colo 26 (figura 6A) y L540 (figura 6B). No se encontró retardo del crecimiento del tumor en ratones tratados con solución salina o IgM de control. No se observó toxicidad en ratones tratados con anticuerpos anti-FS, y los órganos normales conservaron su morfología inalterada, en forma no distinguible de los ratones no tratados o tratados con solución salina.

La regresión del tumor empezó 24 horas después del primer tratamiento y los tumores continuaron reduciendo su tamaño por los próximos 6 días. Esto se observó en modelos de tumores tanto singénicos como inmunocomprometidos, indicando que el efecto fue mediado por el(los) mecanismo(s) independiente(s) del estado inmune. Además, la reducción de la carga tumoral estuvo asociada con el incremento de atención y apariencia en general saludable de los animales, en comparación con ratones de control que tenían tumores mayores que 1,500 mm^3. El nuevo crecimiento de los tumores ocurrió de 7 a 8 días después del primer tratamiento.

Los resultados obtenidos con el tratamiento anti-FS de tumores L540 son además apremiantes por las siguientes razones. Notablemente la necrosis del tumor observada en el tratamiento del tumor L540 ocurrió a pesar del hecho de que el porcentaje de vasos cuya tinción fue positiva para la FS en tumores L540, fue menor en tumores HT29 y NCI-H358. Esto implica que una necrosis, inclusive más rápida, hubiese resultado probablemente cuando se llevara a cabo el tratamiento de otros tipos de tumores. Además, los tumores L540 se seleccionan generalmente como un modelo experimental porque pueden proporcionar secciones histológicas limpias y porque se sabe de hecho que son resistentes a la necrosis.

EJEMPLO X

Efectos Antitumorales del Anticuerpo (9D2) contra Fosfolípidos Aniónicos

Este ejemplo demuestra los efectos del anticuerpo 9D2, que se a la FS y a otros fosfolípidos aniónicos, en estudios antitumorales *in vivo*.

Una dosis alta (>150 µg) del anticuerpo de rata que se une a los fosfolípidos aniónicos, el 9D2, se inyectó a ratones desnudos que tenían tumores H358. Los estudios de inmunolocalización muestran que se localizó fuertemente en el endotelio del tumor (4+), aunque se observó cierto nivel bajo de unión no específico del 9D2 por vasos normales debido a la alta dosis (como se hubiese observado para un anticuerpo IgM de control de especificidad irrelevante).

Cuando se inyectó 9D2 i.p. en un ratón SCID con un tumor L540 para la producción de ascitis, el tumor se volvió necrótico y se colapsó. Tras la inyección de un anticuerpo de control (MK 2.7, IgG de rata) en un ratón SCID con un tumor L540, no se observaron efectos similares.

El efecto del anticuerpo anti-FS, 9D2, sobre el crecimiento de tumores L540 *in vivo* se determinó después de manera más precisa. El tratamiento comenzó cuando los tumores alcanzaron de 200 a 250 µl (día 0). Del día 0 al día 7, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con aproximadamente 150 µg de IgM (200 µl de sobrenadante) o 200 µl de DMEM al 10%. Del día 7 al día 22 los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con aproximadamente 300 µg de IgM (400 µl de sobrenadante) o 400 µl de DMEM al 10%. El día 22 fue el último día de tratamiento y los ratones fueron sacrificados.

Como se muestra en la Tabla 12, de los días 10 al 22, el crecimiento del tumor es inhibido generalmente en aproximadamente 40% a 50%. Al final del estudio sólo 4 ratones del grupo tratado tenían tumores con un volumen mayor de 2000 µl, a diferencia de 9/9 del grupo de control.

TABLA 12

Efectos de los Anticuerpos Anti-FS en Tumores L540 In Vivo					
Día después del inicio del tratamiento	Volumen Promedio del Tumor (µl)		% de Inhibición	Número de ratones con un volumen del tumor > 2000 µl	
	Control	Tratado		Control	Tratado
0	341	320	6.2	0	0
1	464	325	10,8	0	0
3	412	415	0	0	0
7	687	455	33,8	0	0
10	904	544	39,9	1/9	0
13	945	545	42,4	1/9	0
15	1373	685	50,1	4/9	1/10

17	1426	842	41,0	4/9	4/10
20	1992	987	50,5	6/9	4/10
22	2560	1365	53,3	9/9	4/10

En otro estudio *in vivo*, los efectos del anticuerpo anti-FS de rata en el crecimiento de tumores L540 en ratones SCID CB17, se siguieron durante 45 días después de inyecciones de células tumorales. Estos ratones que tenían tumores fueron tratados con 300 µg de anticuerpo anti-FS diariamente, i.p. o con 300 µl de DMEM al 10% diariamente, i.p., como un control. Varios parámetros del tratamiento del tumor fueron notablemente mejores en el grupo tratado en comparación con los de los controles (Tabla 13).

TABLA 13

Efectos de los Anticuerpos Anti-FS en Tumores L540 In Vivo		
Otros parámetros	Control	Tratados
% De tumores que sufrieron regresión[1] (60 días después del tratamiento)	0	40%
% De tumores que sufrieron regresión[1] (90 días después del tratamiento)	0	20%
Volumen promedio de tumores secundarios (µl)*	537 ± 30	366 ± 56
[1]Tumores demasiado pequeños para la medición en ratones tratados en los tiempos indicados (60 días frente a 90) después del tratamiento [2]Metástasis en nodos linfáticos		

En un estudio adicional, el anticuerpo 9D2 se inyectó por vía intraperitoneal a una dosis de 100 µg, 3 veces por semana, a ratones con tumores L540. El tamaño del tumor se midió con calibradores dos veces por semana. Los efectos antitumorales en comparación con el grupo de control se presentan en la figura 7. Los números entre paréntesis indican el número de ratones con tumores que habían sufrido regresión por el número total de ratones por grupo.

EJEMPLO XI

Efectos Antitumorales del Anticuerpo Anti-FS 3G4

El presente ejemplo demuestra efectos antitumorales adicionales usando el anticuerpo anti-PS 3G4 en modelos de tumores singénicos y xenogénicos. El anticuerpo 3G4 usado en este estudio es un anticuerpo IgG que se une a la FS y a otros fosfolípidos aniónicos (Ejemplo IV).

A. Protocolos para Estudios de Tumores en Animales

Los efectos del 3G4 fueron examinados en modelos de tumores singénicos y xenogénicos. El protocolo general para los estudios de tratamiento de tumores en animales se lleva a cabo de la siguiente manera. Al menos que se especifiquen diferencias particulares, este es el protocolo usado en todos los estudios de la presente solicitud.

Los animales se obtuvieron de Charles Rivers Laboratories. Los ratones son ratones hembra de 4 a 5 semanas, SCID C.B-17 o SCID Fox Chase. Los ratones se alojan en jaulas con autoclave, alimento estéril y agua, con manipulación estéril. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en campanas de flujo laminar. Los ratones se aclimatan una semana y luego se les marca en la oreja y se toma una muestra de sangre (aproximadamente de 75 a 100 µ0, de la vena de la cola para verificar la falta de fugas por ELISA. Cualquier ratón que no pase la prueba ELISA de falta de fuga no deberá ser usado para los procedimientos de prueba. Los ratones son inyectados ortópticamente con células de tumor en un panículo adiposo mamario (PAM) o por vía subcutánea en el flanco derecho de 2 a 3 días después del marcado en la oreja y extracción de la muestra de sangre.

En el modelo ortotópico, 1 x 10^7 células en 0,1 ml de DMEM son inyectadas típicamente en el PAM de ratones anestesiados. Los ratones son anestesiados con 0.075 ml de cóctel de ratón inyectado por vía intraperitoneal. El cóctel de ratón en 5 ml de Ketamina (100 mg/ml); 2.5 ml de Xilazina (20 mg/ml); 1 ml de Acepromazina (10 mg/ml); y 11 ml de agua estéril. La dosificación es de 0,1 ml por 20-30 gramos de peso corporal a través de la vía intraperitoneal durante un tiempo de 30 minutos.

Una vez que el ratón se encuentra anestesiado, lo cual se mide porque no hay respuesta al pinchado en el dedo/pata, el ratón se coloca sobre su lado izquierdo y se frota con etanol al 70% justo detrás de la cabeza y alrededor del área de la pata derecha/espalda. Se realiza una incisión de 2-3 mm justo detrás de la pata derecha (tórax lateral), lo cual revela un panículo adiposo blancuzco cuando se levanta el colgajo de piel. Se inyectan 0.1 ml de célula en el panículo adiposo usando una jeringa de 1 ml y una aguja calibre 27, produciendo un glóbulo en el panículo adiposo. La incisión se cierra usando una pinza para heridas estéril de 9 mm. El ratón se regresa a su jaula y se observa hasta que ha despertado de la anestesia y puede moverse. Se determina el estado de salud posterior a la operación, y si se observan signos de inquietud se proporciona al animal acetaminofeno (0.24 mg/ml) + codeína (0.024 mg/ml) en el

agua de beber. La pinza para herida se retira después de 1 semana. Este método se usa de manera tal que las células sean colocadas exactamente en el sitio seleccionado y no en la región subcutánea. Los tumores tendrán un volumen de aproximadamente 200 µl (LxWxW) en 14-15 días y la velocidad de captación es esencialmente del 100%.

En el modelo subcutáneo los ratones son inyectados típicamente con 1 x 10^7 células en 0,2 ml. Los ratones no son anestesiados pero son restringidos usando un sujetador estacionario de la piel del ratón expuesta en el flanco derecho. Se usa una jeringa de 1 ml con una aguja de calibre 23 para inyectar 1 x 10^7 células en 200 µl justo debajo de la piel de los ratones y se observará un glóbulo. No es inusual observar una pequeña cantidad de fuga de fluido del sitio de inyección. Se puede usar un movimiento de giro cuando se retire la aguja de la inyección subcutánea para reducir esta fuga. Se mide el volumen del tumor como LxWxH.

En el protocolo de perfusión, los ratones se inyectan por vía intravenosa con 1000 U de heparina en 0.2 ml de solución salina. Los ratones son sedados después inyectando al ratón por vía intraperitoneal 0.1 ml de cóctel de ratón. Una vez que el ratón se encuentra suficientemente sedado, lo cual se mide al no haber reflejo cuando se pincha el dedo/pata, la cavidad torácica se abre para exponer el corazón y los pulmones. Una aguja de calibre 30 unida a un tubo y a bomba de perfusión se inserta en el ventrículo izquierdo. El ventrículo derecho se recorta de manera que pueda gotear sangre. Se bombea solución salina a través del sistema durante 12 minutos a una velocidad de 1 ml por minuto. Al final de la perfusión, se retiran la aguja y el tubo. Los tejidos se extirpan para estudios adicionales, ya sea mediante inmunohistoquímica o patología.

B. Resultados del Tratamiento de Tumores

Para el modelo singénico, se usaron células de tumor de fibrosarcoma de ratón Meth A. En un modelo xenogénico, se sembraron células de tumor de mama MDA-MB-231 humano en el panículo adiposo mamario. En otro modelo xenogénico, se estableció un xenoinjerto grande L540 de linfoma de Hodgkin humano, inyectando células y permitiendo que el tumor creciera hasta un tamaño mayor hasta 500 mm^3 antes del tratamiento. Los ratones que tenían tumores (10 animales por grupo) fueron inyectados por vía intraperitoneal con 100 µg de anticuerpo anti-FS 3G4 (IgG) en vez que el control. El tratamiento se repitió 3 veces por semana. Los animales se monitorizaron dos veces por semana para realizar mediciones de los tumores.

El crecimiento tanto de tumores singénicos como xenogénicos fue inhibido eficazmente mediante el tratamiento con anticuerpos anti-FS 3G4. El tratamiento para los primeros 20 a 30 días se muestra en la figura 8A, figura 8B, y figura 8C. Los anticuerpos causaron daño vascular en el tumor, trombosis localizada y necrosis del tumor.

El tratamiento de las células del tumor Meth A, singénico, fue particularmente exitoso, y el tratamiento de las células de tumor de mama MDA-MB-231 humano, con crecimiento en el panículo adiposo mamario, produjo también regresiones de los tumores (figura 8A y figura 8B). Inclusive en ratones que tenían tumores L540 grandes, conocidos por ser resistentes a la necrosis, el tratamiento con el anticuerpo 3G4 inhibió el crecimiento del tumor en comparación con el control. No se encontró retardo del crecimiento del tumor en los ratones de control. No se observó toxicidad en ratones tratados con anticuerpos anti-FS.

También se establecieron tumores usando células MD-MBA-435s y tratadas como se describió anteriormente. El crecimiento de estos tumores fue inhibido eficazmente mediante el tratamiento con el anticuerpo 3G4. El tratamiento de tumores L540 grandes, MDA-MB-231 y células de tumor MD-MBA-435s, por 60 días, se muestra en la figura 8D, figura 8E y figura 8F. Los anticuerpos causaron un daño vascular al tumor, trombosis y necrosis y retardaron el crecimiento del tumor sin evidencia de toxicidad.

Se obtuvieron células de lucerifasa MD-MBA-435s del DR. Angeles Sierra Jiménez, Barcelona, España y se cultivaron en DMEM al 10%. Los ratones fueron inyectados con células tumorales como se describió anteriormente, y a las 2 semanas después de la inyección, los tumores se midieron y se registró el volumen. El tratamiento de ratones con tumores de volúmenes promedio similares (200 mm^3) se llevó a cabo usando el anticuerpo 3G4 y el anticuerpo 3G4 quimérico, producido como se describió en el ejemplo XIX, frente al control. El tratamiento fue iniciado mediante inyección IP (800 µg) el día 15 y se continuó con inyecciones de 200 µg cada dos a tres días hasta la inyección final de 400 µg el día 35. Los volúmenes de los tumores y los pesos corporales de los ratones se midieron en los días de inyección. Los ratones fueron sacrificados y perfundidos con solución salina por 12 minutos. Los órganos y el tumor se extirparon, se congelaron a presión en nitrógeno líquido y el tumor se seccionó para el análisis inmunohistoquímico.

Este estudio mostró que tanto el anticuerpo 3G4 como el anticuerpo 3G4 quimérico retardaron eficazmente el crecimiento del tumor al contrario que el control (figura 8G).

EJEMPLO XII

Efectos Antivirales y Anticuerpos Anti-FS Contra el CMV

Cambiando sorprendentemente los campos de la vasculatura del tumor en infecciones virales, los inventores razonaron después que los anticuerpos para aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos hubiesen ejercido también

probablemente un efecto antiviral. El presente ejemplo muestra en efecto que esto es cierto, usando primero el anticuerpo 3G4 en el tratamiento de la infección por citomegalovirus (CMV).

A. Métodos

1. Tratamiento de Células Infectadas con CMV In Vitro

Monocapas confluentes de fibroblastos de prepucio diploide humano (HHF-R2) en placas de 6 pocillos, fueron infectadas con CMV humano AD169 que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) con una MOI=0.01 como se describió previamente (Bresnahan *et al.*, 1996). Brevemente las células fueron incubadas con el virus en un volumen total de 1 ml por pocillo a 37°C durante 90 minutos. Durante la infección las placas fueron sometidas a un movimiento oscilante suave cada 30 minutos. Después de la infección se retiró el sobrenadante de células y a cada pocillo se añadió DMEM/FBS al 10%/pen-estrep (2 ml por pocillo).

Se añadieron diluciones de 3G4 o el anticuerpo de control del mismo isotipo GV39G (100 µg/ml y 50 µg/ml) a los pocillos. Las células infectadas se incubaron a 37°C durante 19 días. En cada pocillo, el medio y el anticuerpo se reemplazaron cada 3 días. El día 19 las células y los sobrenadantes de cada pocillo se recogieron y se congelaron a -80°C hasta que se realizaron los ensayos en placas.

2. Microscopía de Fluorescencia

El CMV recombinante expresa la GFP bajo el control del promotor SV40 de en la presente memoria que las células infectadas aparecen verdes al microscopio de fluorescencia. En estos estudios, las células infectadas por CMV, tratadas con el anticuerpo, fueron observadas con un microscopio de fluorescencia los días 2, 3 y 9.

3. Ensayos en Placas

Los ensayos en placas se llevaron a cabo usando protocolos estándares. Brevemente las suspensiones de células congeladas fueron descongeladas rápidamente a 37°C y centrifugadas para retirar los desechos a 1000 rpm por 1 minuto. Diferentes diluciones de los sobrenadantes de células fueron adicionadas a monocapas subconfluentes de células HHF-R2 en placas de 6 pocillos y las células fueron incubadas a 37°C durante 90 minutos (las placas fueron agitadas suavemente con movimiento oscilante cada 30 minutos). Después de la infección los sobrenadantes de células se eliminaron y se reemplazaron con 2 ml de DMEM/ FBS al 10%. El día 4, se eliminó el sobrenadante de cada pocillo y las células se cubrieron con agarosa al 0,01% de bajo punto de fusión/DMEM/FBS al 10%. Las placas se incubaron a 37°C durante un total de 14 días después de la infección. El día 14 las monocapas infectadas se fijaron con formalina al 10% regulada y se tiñeron con azul de metileno para visualizar las placas.

B. Resultados

1. El 3G4 Inhibe la Diseminación Viral del CMV

Para investigar si el 3G4 tiene un efecto inhibidor en la infección y replicación por el CMV, fibroblastos humanos confluentes fueron pretratados con 3G4 antes de que se adicionara el CMV con una m.o.i. baja. El CMV usado en estos estudios expresa la proteína fluorescente verde (GFP). De en la presente memoria que las células afectadas aparecen verdes cuando se observan al microscopio de fluorescencia.

El día 3 del tratamiento, tanto con una cantidad de 50 µg/ml como 100 µg/ml de anticuerpo, se presentan células infectadas individuales en pocillos sin tratar y en pocillos tratados con 3G4 o con anticuerpo de control igualado al isotipo, GV39. De esta manera, el tratamiento de los fibroblastos con 3G4 no parece inhibir significativamente la entrada del virus a las células.

El día 9, no obstante, existe una drástica diferencia en el número de células infectadas en los pocillos tratados con 3G4 frente al control, tratados con GV39G (figura 9A y figura 9B; comparar el panel derecho superior con los paneles derechos central e inferior). Aunque el virus se ha diseminado aproximadamente en 80% de la monocapa en los pocillos de control, el virus se encuentra restringido a la célula infectada individualmente, original, en los pocillos tratados con 3G4. De en la presente memoria que el 3G4 limita a la diseminación del CMV desde la célula infectada original, hacia las células circundantes. Esta inhibición de la diseminación viral es observada cuando las células son tratadas con 100 µg/ml (figura 9A) y 50 µg/ml (figura 9B).

2. La inhibición Viral es Dependiente de la Concentración del Anticuerpo

A fin de determinar qué concentración de 3G4 es necesaria para el efecto antiviral a una m.o.i. baja, las células infectadas fueron tratadas con diferentes concentraciones de 3G4 y el anticuerpo de control, GV39G. Como se muestra en la figura 10, la inhibición completa de la diseminación de célula a célula se observa con el 3G4 a razón de 100 µg/ml y 50 µg/ml. Cuando las células tratadas con 25, 12.5 y 6.25 µg/ml de 3G4, existen números crecientes de células infectadas con CMV positivas a la GFP. Aunque el 3G4 no previene totalmente la diseminación viral a partir de

las células infectadas primarias, a estas concentraciones más bajas, todavía tiene un efecto antiviral significativo, dado que menos células infectadas con CMV positivas a la GFP, son observadas en el pocillo tratados 3G4, en comparación con los pocillos de control tratados con GV39G (figura 10).

3. Cuantificación de la Carga Viral a una M.O.I. Baja

El efecto antiviral del 3G4 fue cuantificado llevando a cabo ensayos en placas para determinar la carga viral después del tratamiento con el anticuerpo. Los controles incluyeron células sin tratar, el anticuerpo GV39G y un control de anticuerpo adicional usando el anticuerpo C44, un anticuerpo isotipo IgG2a de ratón para la colchicina.

El tratamiento de las células infectadas (m.o.i.=0,01 ufp/célula) con 100 µg/ml de 3G4 dio por resultado una drástica disminución de 6 $\log_{10}$ en la titulación viral en comparación con el control, células tratadas con GV39G (figura 11A). Esta inhibición se traduce en una inhibición de aproximadamente el 99.9999% de replicación viral. A una concentración de 50 µg/ml, el tratamiento con 3G4 da por resultado una disminución de 3.5 $\log_{10}$ en la titulación viral, en comparación con el tratamiento con GV39G. Usando 3G4 a razón de 25 µg/ml y 12,5 µg/ml, los resultados son aún drasticos, e incluso a razón de 6,25 µg/ml se observa todavía un efecto inhibidor (figura 11A).

4. Cuantificación de la Carga Viral a una M.O.I. Alta

El tratamiento con 3G4, de fibroblastos infectados a una M.O.I. alta de 3 dio por resultado también una reducción drástica en la titulación viral. A razón de 100 µg/ml, el tratamiento con 3G4 dio por resultado una reducción de 5 $\log_{10}$ en la titulación viral en comparación con el control, las células tratadas con GV39G (figura 11B). A razón de 50 µg/ml, el 3G4 inhibió la replicación viral por 3 logaritmos cuando se comparó con el GV39G (figura 11B).

5. Inhibición de la Replicación en una Etapa Tardía

Para determinar qué etapa del ciclo replicativo del CMV es bloqueada por el 3G4, se llevó a cabo un estudio de adición cronometrado. Para éste, se añadió 3G4 a fibroblastos infectados con una m.o.i. alta en diferentes puntos temporales después de la infección. La carga viral (tanto en las células como en el sobrenadante) fue cuantificada usando un ensayo en placa estándar.

La adición de 3G4 hasta 24 horas después de la infección dio por resultado una disminución de 5-6 $\log_{10}$ en la titulación viral (figura 11C). Sin embargo, cuando la adición del 3G4 se retardó hasta 48 horas, el efecto inhibidor del 3G4 se redujo a 2 $\log_{10}$ y cuando la adición se retardó a tiempos de 72 a 96 horas, el efecto inhibidor se redujo adicionalmente. Esto muestra que el 3G4 interfiere con una etapa tardía de la replicación del CMV que ocurre entre 24-48 horas después de la infección. De esta manera, el 3G4 no interfiere significativamente con la infección o con la expresión genética temprana o inmediata temprana. Más bien actúa después en el ciclo de replicación viral, por ejemplo, en la expresión genética tardía, en la síntesis de ADN viral, acondicionamiento o salida viral.

EJEMPLO XIII

Efectos Antivirales de los Anticuerpos Anti-FS contra el RSV

Además de los efectos antivirales drásticos contra el CMV mostrados en el ejemplo XII, el presente ejemplo demuestra el uso de tres anticuerpos anti-FS diferentes en la inhibición de la replicación del Virus Sincitial Respiratorio (RSV).

A. Métodos

1. Tratamiento de Células Infectadas por RSV In Vitro

Se cultivaron células A-549 hasta el 100% de confluencia en tres placas para cultivo de tejidos de 12 pocillos Costar. A los pocillos se añadieron 200 µl de medio de Eagle esencial mínimo. Se añadió anticuerpo antifosfolípido (Ab) (100 µg en 100 µl) a 9 pocillos de cada placa y 30 minutos después las células en 6 de esos 9 pocillos iniciales fueron infectadas con una MOI de 1 con la cepa grande de RSV en un volumen de 100 ul. Los tres pocillos restantes se dejaron como pocillos no infectados, tratados con el anticuerpo. Los otros tres pocillos sin anticuerpos fueron infectados con RSV a la misma MOI que la descrita anteriormente.

Cada placa se usó para probar los tres diferentes anticuerpos 3G4, 3SB y 1B9 (ejemplo IV). Las células fueron incubadas en 5% de CO_2 a 40°C durante 2 horas y después se añadieron 600 µl del medio para completar un volumen de 1 ml en cada pocillo. Una placa de células A-549 se mantuvo en las mismas condiciones que las del control. Los sobrenadantes se recogieron a las 4, 24 y 72 horas después de la infección. En cada punto temporal se muestrearon cuatro pocillos de cada placa: un pocillo sólo con células tratadas con Ab, dos pocillos tenían células tratadas con Ab/infectadas con RSV y un pocillo solo tenía células infectadas con RSV. Las muestras se congelaron a -80°C hasta su ensayo en placa.

2. Ensayos en Placas

Los ensayos en placas se llevaron a cabo como se describió previamente (Kisch *et al.*, 1963; Graham *et al.*, 1988). Brevemente, las suspensiones de células congeladas fueron descongeladas rápidamente a 37°C. Tres diluciones de 10 veces fueron realizadas a partir de los sobrenadantes de células no diluidas: 10^{-1}, 10^{-2}, y 10^{-3}. 100 µl de cada dilución más la muestra no diluida, fueron inoculados en placas de la línea celular Hep-2 con confluencia del 80%, todas por triplicado. Las placas fueron colocadas en la incubadora con 5% de CO_2 y a 40°C, durante 5 días. El día quinto las placas fueron reveladas y teñidas con hematoxilina y eosina para revelar las placas en cada pocillo. Las placas se contaron usando un microscopio de disección para calcular la carga viral de RSV en ufp (unidades formadoras de placas)/ml.

B. Resultados

Como se observa en la figura 12, el tratamiento de células infectadas con RSV, ya sea con 3SB o 1B9, dieron por resultado una reducción logarítmica en la replicación viral. El efecto antiviral fue inclusive más pronunciado cuando las células infectadas fueron tratadas con 3G4. El tratamiento con 3G4 dio por resultado una reducción 2 $\log_{10}$ en la titulación viral (figura 12). La inhibición fue menor que la observada con el CMV, lo más probable porque la concentración del 3G4 era baja (25-50 µg/ml).

EJEMPLO XIV

Anticuerpos Anti-FS de Cadena Sencilla

Dado los muchos usos de los anticuerpos anti-FS descritos en la presente memoria, incluyendo como agentes antitumorales, solamente, como agentes de localización de objetivos para suministrar agentes terapéuticos unidos a tumores, y como agentes antivirales, el presente ejemplo describe técnicas apropiadas para generar anticuerpos anti-FS de cadena sencilla (scFv), es decir, donde los dominios V_h y V_l se encuentran presentes en una cadena polipeptídica sencilla, unida generalmente por un enlazador peptídico.

A. Preparación de la Biblioteca de Anticuerpos de Fagos

El conjunto secundario de la biblioteca bacteriana (aproximadamente 1 x 10^{10} clones) fue inoculado en 100 ml de 2xTY que contenían 100 µg/ml de ampicilina y 1% de glucosa. Se cultivó con agitación a 37°C hasta que la DO a 600 nm era de 0.5.

El fago auxiliar M13KO7 fue adicionado a razón de 10^{13} ufp y se incubó con agitación en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Las células infectadas fueron centrifugadas a 3,500 g por 10 minutos. El sedimento se volvió a suspender en 200 ml de 2xTY que contenían 100 µg/ml de ampicilina y 75 µg/ml de kanamicina y se incubó con agitación a 30°C durante toda la noche.

El cultivo se centrifugó a 10,800 g por 10 minutos. 1/5 del volumen de PEG/NaCl se adicionó al sobrenadante, se mezcló bien y se dejó durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 10,800 g durante 30 minutos. El sedimento se volvió a suspender en 40 ml de PBS y se añadieron 8 ml de PEG/NaCl. Se mezcló y se dejó durante 20 minutos a 4°C. Se centrifugó a 10,800 g por 10 minutos y se aspiró el sobrenadante. El sedimento se volvió a suspender en 2 ml de suero humano al 10% y se centrifugó a 11,600 g durante 10 minutos en una microcentrífuga para eliminar la mayor parte del desecho bacteriano restante.

Previo a la selección, la biblioteca de anticuerpos de fagos en suero humano al 10% fue adicionada a la placa recubierta con FC y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente.

B. Selección de Liposomas Tratados con biotina

20 µmol de fosfatidilinositol y 20 µmol de fosfatidilserina marcada con biotina se disolvieron en 10 ml de hexano. Esta solución se secó hasta producir una delgada capa sobre la superficie de un matraz usando un evaporador rotatorio. Se añadieron 2 ml de PBS y se colocó en un baño de ultrasonidos a 4°C durante 30 minutos.

100 µl del fago scFv y 100 µl de liposomas tratados con biotina, fueron mezclados después en presencia de 10% de suero humano y se hizo girar suavemente por una hora a temperatura ambiente. El bloqueo se realizó con 100 µl de dinaperlas M-280 de estreptavidina adicionando 600 µl de 2.5% de caseína/0.5% de BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las perlas se separaron de la solución tampón de bloqueo con un MPC-E (Concentrador de Partículas Magnéticas de Dynal) durante 4-5 minutos.

Las perlas se volvieron a suspender en 100 µl de PBS. Se añadieron 100 µl de dinaperlas de estreptavidina bloqueada, al fago enlazado al antígeno marcado con biotína y se hizo girar suavemente durante 15 minutos a temperatura ambiente. La separación se consiguió con un MPC-E durante 5 minutos y sobrenadante se eliminó virtiéndolo. Se lavó 5 veces con 1 ml de PBS. Para cada lavado, las perlas volvieron a suspenderse y volvieron a precipitarse con un MPC-E.

Finalmente el fago se eluyó de las perlas volviendo a suspenderlo en 300 µl de trietilamina 100 mM durante 30 minutos. Para la neutralización se añadieron 150 µl de Tris 1 M, pH = 7,4 las perlas se separaron nuevamente con el MPC-E.

Se usaron 150 µl de sobrenadante de fagos para infectar 10 ml de bacterias TG1 en la fase logarítmica. Los 10 ml del cultivo se agitaron en presencia de 20 µg/ml de ampicilina a 37°C por una hora. La ampicilina se adicionó a la concentración final de 50 µg/ml y se agitó durante otra hora. Se añadieron 10^{13} ufp del fago auxiliar M13 a este cultivo, se transfirieron a 100 ml del medio 2TY que contenían 100 µg/ml de ampicilina y se agitaron a 37°C por una hora. Se adicionó kanamicina a la concentración final de 100 µg/ml y se agitó a 30°C durante toda la noche.

El procedimiento de preparación de los fagos se repitió y el procedimiento de selección se repitió otras 3 o 4 veces.

C. ELISA para Anticuerpo Monoclonal de Cadena Sencilla

Colonias HB2151 individuales de las placas (después de 4 rondas de selección) se inocularon en 500 µl de 2xTY que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 1% de glucosa en placas de 96 pocillos y se cultivaron con agitación (300 rpm) durante toda la noche a 37°C. 5 µl de esta placa fueron transferidos a una segunda placa de 96 pocillos que contenía 500 µl de 2xTY que contenía 100 µg/ml de ampicilina por pocillo y se cultivó con agitación a 37°C por 3 horas (OD600=0.9).

A cada pocillo se añadieron 50 µl de 2xTY que contenía 100 µg/ml de ampicilina, IPTG 10 mM (la concentración final es de 1 mM), que se cultivó con agitación durante toda la noche a 30°C. Se centrifugó a 1,800 g por 10 minutos y se usaron 100 µl del sobrenadante en el ELISA.

Placas de 96 pocillos (DYNEX IMMULON®1B) fueron recubiertas con FS disuelto en etanol a una concentración de 10 µg/ml (el solvente P6641 a razón de 10 mg/ml fue Cloroformo: MeOH 95:5). Se recubrieron 10 µg/ml de FC en la misma forma. Estas placas fueron evaporadas a 4°C en el cuarto frío. Se añadieron 250 µl de caseína al 2.5% a cada pocillo, y las placas se recubrieron y bloquearon a 37°C durante 1 hora.

Los pocillos se enjuagaron 3 veces con PBS, y 100 µl/pocillo de suero humano al 10% y 100 µl/pocillo de sobrenadante que contenía scFv soluble se añadieron e incubaron por 60 minutos a 37°C. La solución se descartó y se lavó 6 veces con PBS. 100 µl de 9E10 en 5% de caseína/0.5% de BSA-PBS (dilución de 1:5000) se añadieron a cada pocillo, se incubaron a 37°C durante 1 hora y se lavaron 6 veces con PBS. 100 µl de anticuerpo de antiratón de cabra HRP (dilución de 1:10000) se añadieron a cada pocillo, se incubaron a 37°C durante 1 hora y se lavaron 5 veces con PBS. Se añadieron 100 µl de OPD al 0,05% a cada pocillo y se desarrollaron durante 5 minutos. Se añadieron 100 µl de H_2SO_4 0,18 M para detener la reacción y realizar la lectura a una D.O. de 490.

Clones positivos al antígeno se sembraron en estrías sobre placas 2xTYAG y se cultivaron durante toda la noche a 30°C. Las colonias individuales positivas fueron capturadas en 3 ml de medios 2xTYAG y fueron cultivadas 12 horas a 37°C. Los plásmidos se extrajeron y los insertos de genes scFv se verificaron mediante digestión enzimática y PCR. Se secuenciaron los insertos con el tamaño correcto.

Las colonias con los insertos del tamaño correcto fueron cultivadas en 100 ml de medio 2xTYAG y se agitaron a 37°C con uns DO 600=0,5. Estos fueron transferidos a 900 ml de 2xTYA y se cultivaron hasta que la DO 600=0,9. Se añadió IPTG 1 M a una concentración final de 1mM y se agitó a 30°C durante toda la noche. El sobrenadante se verificó usando el mismo método de ELISA citado anteriormente. La proteína scFv se purificó de la fracción periplásmica usando cromatografía de afinidad de Ni^{++}-agarosa.

D. Resultados

Después de 4 rondas de panorámica, los siguientes clones dieron una señal de ELISA prometedora en placas de FS y tenían el inserto con tamaño correcto: 3E5, 3A2, G5, C8, E4 y 4D5. Estos han sido subclonados, en donde E4 dio 5 subclones positivos y 4D5 5 subclones positivos (Tabla 14).

TABLA 14

ELISA Sobre Placa de FS											
0.099	0.107	0.118	0.115	0.100	0.094	0.084	0.086	0.166	0.164	0.102	0.191
0.113	0.106	0.127	0.150	0.128	0.097	0.078	0.087	0.190	0.144	0.102	0.154
0.122	0.115	0.117	0.112	0.105	0.097	0.085	0.088	0.230	0.071	0.168	0.150
0.107	0.108	0.121	0.123	0.107	0.101	0.083	0.085	0.191	0.246	0.186	0.150
0.138	0.121	0.114	0.131	0.100	0.096	0.082	0.079	0.183	0.187	0.275	0.171
0.118	0.115	0.116	0.132	0.099	0.094	0.082	0.086	0.185	0.073	0.208	0.102
0.111	0.176	0.126	0.118	0.096	0.087	0.123	0.087	0.144	0.226	0.112	0.126
0.102	0.107	0.131	0.125	0.089	0.102	0.082	0.084	0.188	0.073	0.142	0.151
3E5		3A2		G5		C8		E4		4D5	

Una vez que fueron identificados los clones positivos, estos fueron secuenciados. La secuencia de proteínas y de ácidos nucleicos del ScFv, del clon 3A2, se presenta en la SEC ID NO: 5 y en la SEC ID NO: 6, respectivamente. Los clones positivos fueron cultivados a gran escala y el scFv se purificó usando cromatografía de afinidad de níquel y agarosa. El scFv purificado se obtuvo usando electroforesis en gel Phast.

EJEMPLO XV (ejemplo de referencia)

Síntesis de Derivados de Péptidos de Unión a la FE

El presente ejemplo concierne al diseño y síntesis de derivados y conjugados de péptidos de unión a la FE, ejemplares, para el uso en el tratamiento de tumores y enfermedades virales. Las estructuras para los derivados de duramicina ejemplares se presentan en los paneles de la figura 13A a 13O, que coinciden con la siguiente descripción.

A. DLB

0.5 mg (0.25 µmol) de duramicina disueltos en 0.387 ml de $NaHCO_3$ 0.1 M en agua fueron adicionados a 0.113 mg (0.25 µmol) de NHS-LC-Biotina (Sigma). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego a 4°C durante toda la noche. La muestra se cargó en una columna de sílice, se lavó con ácido trifluoroacético al 0.1% (TFA), se eluyó con TFA al 0.1% y CH_3CN al 70%. El eluyente se recogió y se concentró por centrifugación. El rendimiento total fue de 0.5 mg (Fig 13A).

B. DIB

0.5 mg (0.25 µmol) de duramicina disueltos en 0.286 ml de $NaHCO_3$ 0,1 M en agua fueron adicionados a 0,034 mg (0.25 µmol) de clorhidrato de 2-iminotiolano (2-IT). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. 0.13 mg (0.26 µmol) de yodoacetil-LC-Biotina (Pierce) fueron adicionados y la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y a 4°C durante toda la noche. La muestra se cargó en una columna de sílice, se lavó con TFA al 0,1%, se eluyó con TFA al 0,1% y CH_3CN al 70%. El eluyente se recogió y se concentró por centrifugación. El rendimiento total fue de 0,5 mg (Fig 13B).

C. $(DLB)_4NA$

Se disolvieron 1,9 mg (0,94 µmol) de duramicina en 0,5 ml de $NaHCO_3$ 0,1 M en agua. A esto se añadieron 0.4 mg (0.88 µmol) de NHS-LC-Biotina (Sigma) en 200 µl de dimetilformamida (DMF). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadieron 10 mg (0,17 µmol) de neutravidina (NA) en 1 ml a la mezcla de reacción, la cual se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y luego a 4°C durante toda la noche. La mezcla de reacción se cargó después sobre una columna G-25 (volumen de 50 ml) en solución tampón PBS. Las fracciones se recogieron y se analizaron por SDS PAGE (gel phast). Las fracciones que contenían las proteínas (7-16) se extrajeron conjuntamente, se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 µm y la concentración se determinó midiendo la absorción a 280 nm. El rendimiento total fue de 5,1 mg.

La muestra se fraccionó después por FPLC. Se recogieron tres picos que correspondieron a los siguientes: pico 1: $[(DLB)_4NA]_3$ (fracciones 17-23); pico 2: $[(DLB)_4]_2$ (fracciones 24-33) y pico 3: $(DLB)_4NA$ (fracciones 35 48). Todas las muestras se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Los rendimientos finales obtenidos fueron: 0.34 mg de $[(DLB)_4NA]_3$; 0.59 mg de $[(DLB)_4]_2$ y 1.41 mg de $(DLB)_4NA$ (Fig. 13C).

D. $(DLB)_4NA$-F

Se añadieron 0,61 mg de $(DLB)_4NA$ en solución tampón de PBS a 0,005 mg de fluoresceína de N-hidro- xisuccinimidilo (NHS-Fluoresceína) (Sigma) en DMF. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se fraccionó después sobre una columna PD10 (10 ml). El $(DLB)_4NA$-F se eluyó en las fracciones que contenían las proteínas (3 y 4), que fueron extraídas conjuntamente y esterilizadas por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. El rendimiento total fue de 0.5 mg (Fig. 13D).

E. $(DIM)_n$ HIgG

La IgG humana (HIgG) se purificó primero de la siguiente manera: 1.3 ml de HIgG (que incluían 100 mg/ml de HIgG, 22.5 mg/ml de glicina y 3 mg/ml de albúmina en solución tampón de borato con 1 mM de EDTA, pH 9) se aplicó a una columna FPLC (S200, 250 ml). Las fracciones se recogieron y se analizaron por SDS PAGE sobre un gel phast. Las fracciones que contenían la IgG monomérica (21-32) se extrajeron conjuntamente y se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. El rendimiento total determinado por absorción a 280 nm fue de 111 mg.

HIgG purificada (55 mg en 13 ml de solución tampón de borato, pH 9) fue adicionada a 1.003 mg en 0.5 ml de SMCC (Pierce) en DMF. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 1 hora. Al mismo tiempo otra mezcla de reacción que contenía 6 mg de duramicina (3 µmol; se disolvió en 0.5 ml de $NaHCO_3$ 0.1 M) y 0.413 mg de 2-IT (3 µmol; en $NaCO_3$ 0.1 M) se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de finalizar las reacciones las dos

mezclas de reacción fueron combinadas e incubadas a temperatura ambiente por 2 horas y a 4°C durante toda la noche. Los productos de reacción fueron analizados por SDS PAGE sobre un gel phast. Los productos de reacción fueron cargados sobre una columna FPLC en solución tampón de borato, pH 9. Las fracciones FPLC que correspondían al trímero (5-14), dímero (15-24), y al monómero (25-37) fueron extraídas y esterilizadas por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. El rendimiento total del monómero fue de 54,6 mg. De cinco a siete grupos de duramicina fueron unidos a cada molécula de HIgG (Fig. 13E).

F. $(DIM)_n$ HIgG-F

Se añadió 1mg (0,7 ml) de $(DIM)_n$HIgG a 5 µl de NHS-Fluoresceína en DMF. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y se desalificó sobre una columna PD-10. Las fracciones que contenían las proteínas (2-3) fueron extraídas y esterilizadas por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. El rendimiento total fue de 0,9 mg (Fig. 13F).

G. $(DIM)_n$ HIgG-B y $[(DIM)_nHIgG]_2$-B

Para sintetizar los derivados tratados con biotina de $[(DIM)_nHIgG]_2$, 0.66 mg (1 ml) de $[(DIM)_nHIgG]_2$ se añadieron a 8 µl de 1 mg/ml de NHS-LC-Biotina (Pierce) en DMF. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se desalificó después sobre una columna PD-10. Las fracciones que contenían proteína (3 y 4) fueron extraídas y esterilizadas por filtración a través de un filtro de 0.22 µm. El rendimiento final fue de 0.46 mg.

El tratamiento con biotina del monómero $(DIM)_n$HIgG se realizó en la misma manera. Brevemente, 1.06 mg (0.75 ml) de $(DIM)_n$HigG fueron adicionados a 12 µl de 1 mg/ml de NHS-LC-Biotina en DMF. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, el producto de reacción fue desalificado sobre una columna PD-10. Las fracciones que contenían proteínas (3 y 4) fueron extraídas y esterilizadas por filtración a través de un filtro de 0.22 µm. El rendimiento final fue de 0.62 mg (Fig. 13G).

H. $(DIB)_4NA$

2 mg (0.99 µmol) de duramicina fueron disueltos en 0.5 ml de $NaHCO_3$ 0.1 M y se añadieron a 0.136 mg (0.99 µmol) de 2-IT. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, después de esto, se añadieron 0.483 mg (0.95 µmol) de yodoacetil-LC-Biotina (Pierce) y la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. 10 mg (0.17 µmol) de neutravidina en 1 ml de H_2O se añadieron e incubaron a 4°C durante toda la noche. La mezcla de reacción se fraccionó mediante FPLC. Se recogieron y extrajeron tres picos diferentes: $[(DIB)_4NA]_3$ (fracciones 17-23); $[(DIB_4NA]_2$ (fracciones 24-33); y $(DIB)_4NA$ (fracciones 35-48). Todas las muestras fueron esterilizadas por filtración a través de un filtro de 0.22 µm. Los rendimientos totales obtenidos fueron de 0,87 mg de $[(DIB)_4NA]_3$; 1,25 mg de $[(DIB)_4NA]_2$; y 1,83 mg de $(DIB)_4NA$ (Fig.13H).

I. $(DIB)_4NA$-B

Se añadieron 0,023 mg (0,3 µmol) de $(DIB)_4NA$ a 0,9 µg de NHS-LC-Biotina (Pierce). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se desalinizó sobre una columna PD-10. El rendimiento total fue de 0,04 mg (Fig. 13I).

J. DS-1

Se añadieron 5 mg (2,5 µmol) de duramicina disueltos en 0,5 ml de $NaHCO_3$ 0,1 M en agua a 0,319 mg (2,6 µmol) de 1,3-propansultona. La mezcla se incubó a 4°C durante toda la noche. La mezcla se cargó sobre una columna de sílice, se lavó con TFA al 0.1%, se eluyó con TFA al 0,1% y CH_3CN al 70%. El eluyente se recogió y se concentró por centrifugación a presión reducida. El rendimiento total fue de 5 mg (Fig. 13J).

K. DS-2

Se añadió 1 mg (0,497 µmol) de duramicina disuelto en 0,3 ml de $NaHCO_3$ 0,1 M en agua a 0,072 mg (0,523 µmol) de 2-IT. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron 0,125 mg (0,49 µmol) de cloruro de SBF (Pierce). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y a 4°C durante toda la noche. El péptido se purificó sobre una columna de sílice. El eluyente se recogió y se concentró por centrifugación a presión reducida. El rendimiento total fue de 1 mg (Fig. 13K).

L. DS-3

Se añadió 1 mg (0,497 µmol) de duramicina disuelto en 0,4 ml de $NaHCO_3$ 0,1 M en agua a 0,109 mg (0,592 µmol) de anhídrido cíclico del ácido 2-sulfobenzoico. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y a 4°C durante toda la noche. El péptido se purificó sobre una columna de sílice. El eluyente se recogió y concentró por centrifugación a presión reducida. El rendimiento total fue de 1 mg (Fig. 13L).

M. DS-4

Se añadieron 0,25 mg (0,124 µmol) de duramicina disueltos en 0,5 ml de $NaHCO_3$ 0,1 M en agua a 0,017 mg (0,124 µmol) de 2-IT. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se adicionó después a 0.049 mg (0.124 µmol) de reactivo de Ellman. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y durante toda la noche a 4°C. 250 µl de 1 mg/ml de hidrato de la sal monosódica del ácido 4-Amino-5-hidroxi-2,7-naftalendisulfónico se añadieron a 100 µl de 1 mg/ml de 2-IT. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. 50 µl de esta mezcla de reacción se añadieron a la reacción previa y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. El péptido se purificó sobre una columna de sílice. El eluyente se recogió y se concentró por centrifugación a presión reducida (Fig. 13M).

N. DS-5

Se añadieron 5 mg (2,5 µmol) de duramicina disueltos en 0,5 ml de $NaHCO_3$ 0,1 M en agua a 0,356 mg (2,6 µmol) de 1,3-butansultona. La mezcla se incubó a 4°C durante toda la noche. La mezcla se cargó en una columna de sílice, se lavó con TFA al 0.1%, se eluyó con TFA al 0.1% y CH_3CN al 70%. El eluyente se recogió y se concentró por centrifugación a presión reducida. El rendimiento total fue de 5 mg (Fig. 13N).

O. DC-1

Se añadieron 0,25 mg (0,124 µmol) de duramicina disueltos en 0,5 ml de $NaHCO_3$ 0,1 M en agua a 0,017 mg (0,124 µmol) de 2-IT. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se añadió después a 0,049 mg (0.124 µmol) de reactivo de Ellman. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 2 horas y durante toda la noche a 4°C. El péptido se purificó sobre una columna de sílice. El eluyente se recogió y se concentró por centrifugación a presión reducida (Fig. 13O).

EJEMPLO XVI (ejemplo de referencia)

Derivados de Duramicina que se unen Específicamente a la FE

El presente ejemplo muestra que los derivados de duramicina sintetizados en el ejemplo XV son específicos para la FE y por lo tanto pueden ser usados como se diseñaron, uniéndolos a agentes antivirales o de localización dirigida impermeables a las células y para el uso en el tratamiento de tumores y enfermedades virales.

Para probar la especificidad de los derivados de duramicina, particularmente la unión a la FE con preferencia a otros fosfolípidos, se llevó a cabo una serie de ELISAs de competencia. La capacidad de los derivados de duramicina para competir ya sea con la DIB o la DLB para la unión a la FE, fue analizada en el siguiente método.

La FE y la FC se disolvieron por separado en etanol. La concentración final fue de 5 µg/ml. Se añadieron 100 µl a cada pocillo de placas de 96 pocillos para el ELISA (DYNEX IMMULON®1B). Estas placas fueron evaporadas a 4°C en un cuarto frío. Se añadieron 250 µl de caseína al 2,5% a cada pocillo, se cubrieron y se bloquearon a 37 °C durante 1 hora. La solución tampón de bloqueo se desechó y se añadieron 100 µl de caseína al 2,5% a cada pocillo. El compuesto de duramicina se añadió como una dilución en serie a través de la placa, tal como $(DIM)_nHIgG$, (DIB)4NA, (DLB)4NA, DS, duramicina y DIB.

La concentración inicial de $(DIM)_nHIgG$ fue de 1,4 mg/ml, la concentración inicial de (DIB)4NA fue de 800 µg/ml, y la concentración inicial de (DLB)4NA fue de 800 µg/ml. Estas se incubaron a 37°C durante 1 hora y se lavaron 5 veces con PBS. 100 µl de HRP-estreptavidina (dilución de 1:5000) se añadieron a cada pocillo, se incubaron a 37°C durante 1 hora y se lavaron 5 veces con PBS. Se añadieron 100 µl de OPD al 0,05% a cada pocillo y desarrollaron durante 5 minutos. Se añadieron 100 µl de H_2SO_4 0,18 M para detener la reacción y realizar la lectura a una D.O. de 490.

Los datos resultantes se tabularon y después se representaron gráficamente. Como se ilustra a través de los datos de las Figs. 14C y 14D, concentraciones crecientes de los derivados de duramicina reducen la absorbancia a 490 nm, mostrando que los derivados de duramicina compiten con el DIB y DLB por la unión con la fosfatidiletanolamina.

Los perfiles de unión a fosfolípidos, de las construcciones de duramicina, se confirmaron usando ensayos ELISA adicionales. Los lípidos de prueba respectivos FS, FE, FI, CL, FC, FG, EM, y colesterol se disolvieron por separado en etanol y se usaron para recubrir placas del ELISA. Se añadieron compuestos de duramicina como diluciones en serie a través de las placas. Después de las etapas de incubación y lavado, se añadió un reactivo de detección secundario a cada pocillo y se determinó la reactividad usando el ensayo colorimétrico como se describió anteriormente.

En la Fig. 14A se representan perfiles de unión a fosfolípidos, representativos para los derivados de duramicina/biotina, DIB y DLB. Se muestra que el DIB y DLB son específicos para la FE, mostrando unión a cada uno de FS, FI, CL, FC, FG y EM que son despreciables o no detectables. El $(DIM)_nHIgG$-B y $[(DIM)_nHIgG]_2$- B tuvieron esencialmente el mismo perfil de unión que el DLB. Aunque se observó una unión mínima a la FS, a concentraciones elevadas de DIB (Fig. 14A), esto no es significativo en el contexto de este estudio, ya que la unión a la FS no fue

detectable a concentraciones de DIB que fueran de saturación y la mitad del máximo para la unión a la PE. Por lo tanto las construcciones de duramicina se unen específicamente a la fosfatidiletanolamina.

También se demostró que el suero no tenía ningún efecto significativo en la unión a la FE por parte de los derivados de duramicina. Esto se ilustra mediante la unión del derivado de duramicina-biotina, DLB, a placas de ELISA cubiertas con FE, en presencia y en ausencia de suero (BSA), donde los perfiles de unión no muestran diferencias significativas (Fig. 14B).

EJEMPLO XVII (ejemplo de referencia)

Efectos Antivirales de los Derivados de Péptidos de Unión a la PE

Además de los efectos antivirales mediados por los anticuerpos anti-FS, como se muestra en el ejemplo XII y ejemplo XIII, el presente ejemplo demuestra los efectos antivirales de derivados de péptidos que se unen específicamente a otro aminofosfolípido común, FE.

A. Métodos

1. Tratamiento de Células Infectadas con CMV In Vitro

Monocapas confluentes de fibroblastos de prepucio diploide humano (HHF-R2) en placas de 6 pocillos fueron infectadas con AD169 de CMV humano que expresaban la proteína fluorescente verde (GFP) a razón de MOI = 0.01 como se describió en el ejemplo XII (Bresnahan *et al.*, 1996). Las células fueron incubadas con virus en un volumen total de 1.5 ml por pocillo a 37°C durante 90 minutos. Durante la infección las placas fueron agitadas suavemente con movimiento oscilante cada 30 minutos. Después de la infección, el sobrenadante de células se retiró y a cada pocillo se añadió DMEM/FBS al 10%, pen-estrep (2 ml por pocillo).

Se añadieron diferentes diluciones de derivados de duramicina $(DLB)_4NA$, $(DIM)_n$ HIgG, DS-1, DS-2, DS-3 y DC-1 a los pocillos antes de la adición del virus y después de la infección. Las células infectadas se incubaron a 37 °C durante un total de 14 días. El medio y derivado de duramicina en cada pocillo fue reemplazado cada 3 días.

2. Microscopia de Fluorescencia

Como en el ejemplo XII, el CMV recombinante expresa la GFP bajo el control del promotor SV40. De en la presente memoria que las células infectadas aparecen verdes al microscopio de fluorescencia. En estos estudios las células infectadas con CMV, tratadas con derivados de duramicina, fueron observadas al microscopio de fluorescencia los días 4 y 6.

B. Resultados

El día 4, existían células verdes positivas a la GFP, infectadas, individuales, en pocillos no tratados y en pocillos tratados con $(DLB)_4NA$ y $(DIM)_nHIgG$ (Fig. 15, paneles de la izquierda). De esta manera, el tratamiento de las células HHF-R2 con estos derivados de duramicina no parece inhibir la entrada del virus a las células. Existe cierta evidencia preliminar de que los derivados de duramicina DS-1, DS-2, DS-3 inhiben la entrada viral a las células.

El día 6 después del tratamiento con $(DLB)_4NA$ y $(DIM)_nHIgG$, se presenta una marcada diferencia en el número de células positivas a GFP infectadas, en pocillos no tratados en comparación con pocillos tratados con el derivado de duramicina (Fig. 15, paneles de en medio). El día 6, el virus se ha diseminado desde la célula individual infectada observada el día 4, rodeando células en los pocillos no tratados (Fig. 15, parte superior, comparar el panel izquierdo con el panel central). Sin embargo, el día 6 en los pocillos tratados con (DLB)4NA y (DIM)nHIgG, el virus se encuentra limitado a la célula original infectada individualmente (Fig. 15, parte central y parte inferior, comparar los paneles izquierdos con los paneles centrales).

Por consiguiente, el (DBL)4NA y (DIM)nHIgG, limitan la diseminación del CMV de la célula infectada original, a las células circundantes. Esta inhibición de diseminación viral se observa cuando las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de $(DLB)_4NA$ (100 µg/ml y 50 µg/ml) y (DIM)nHIgG (200 µg/ml y 100 µH/ml).

EJEMPLO XVIII

Ventajas del Anticuerpo 3G4

El anticuerpo 3G4 desarrollado por el protocolo único de los inventores, como se describió en el ejemplo IV, tiene muchas ventajas con respecto a los anticuerpos anti-FS de la bibliografia, incluyendo el anticuerpo anti-FS prominente, el 3SB (Rote *et al.* (1993)). El presente ejemplo describe ciertas de esas ventajas.

A. Clase y Especificidad

El 3G4 es un anticuerpo IgG, mientras que el 3SB es IgM. Los anticuerpos de la clase IgG tienen numerosas ventajas con respecto a la IgM, incluyendo mayor afinidad, menor velocidad de eliminación *in vivo* y simplicidad de purificación, modificación y manipulación. Una comparación de la unión a la FS del anticuerpo IgM, 3SB, con 3G4 y otro anticuerpo IgG, se presenta en la Fig. 19A y Fig. 19B.

El 3G4 reacciona fuertemente con los fosfolípidos aniónicos FS, AF, FI, FG y CL, aproximadamente con la misma intensidad, y se une al aminofosfolípido, PE, en forma menos fuerte. No tiene reactividad con FC y EM y tiene el perfil de especificidad de unión siguiente: FS =AF= FI=FG >CL>>FE (ejemplo IV; Tabla 4). El 3G4 no se une de manera detectable a la heparina, al sulfato de heparán o al ADN mono o bicatenario, ni a las proteínas celulares extraídas de células bEnd.3 o en transferencias de Western. La unión del 3G4 no se ve afectada por la presencia de EDTA 5 mM mostrando que el Ca^2+ no es necesario para la unión del 3G4 a los fosfolípidos aniónicos. El 3G4 no se unió a placas de ELISA que se habían cubierto con fosfolípidos pero que después se habían lavado con Tween 20 al 0,2% en solución salina, confirmando que la unión era al fosfolípido absorbido.

El epítope reconocido por el 3G4 parece quedar dentro del núcleo de fosfoglicerol de los fosfolípidos aniónicos, el cual es el mismo en los fosfolípidos de todas las especies de mamíferos. El anticuerpo reacciona entonces con fosfolípidos tanto de ratón como de humano, lo cual es importante para el desarrollo preclínico y clínico. El 3G4 es más específico para fosfolípidos aniónicos que el ligando natural la anexina V. A diferencia del 3G4, la anexina V se une también fuertemente a fosfolípidos neutros en concentraciones fisiológicas de Ca^2+.

La especificidad del 3G4 por los fosfolípidos aniónicos fue confirmada mediante ensayos en los cuales liposomas formados de diferentes fosfolípidos fueron usados para competir por la unión del 3G4 a FS inmovilizado. Los liposomas fueron preparados a partir de soluciones de 5 mg de un fosfolípido individual en cloroformo. Las soluciones fueron secadas bajo nitrógeno para formar una delgada capa en un matraz de vidrio de fondo redondo. Posteriormente se añadieron 10 ml de solución tampón de Tris (0.1 M, pH 7.4) y el matraz se sometió a ultrasonidos cinco veces por 2 minutos. El anticuerpo 3G4 (0.1 µg/ml) se añadió a cada solución tampón o a diferentes liposomas fosfolípidos y fue preincubado durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió a placas cubiertas con FS (después del bloqueo estándar), se incubó durante 1 hora, se lavó y se añadió el anticuerpo secundario. Después de 1 hora las placas se lavaron y se revelaron durante 5 minutos usando OPD.

Como se muestra en el ejemplo IV, el 3G4 se une a FS, FE, FI, FG y CL cuando se encuentran inmovilizados y se une a la FE inmovilizada en menor grado, pero no se une a FC inmovilizada. La capacidad del 3G4 para unirse a FS inmovilizada, en presencia o ausencia de los diferentes liposomas, se muestra en la figura 20. Los resultados de estos estudios de competencia por liposomas muestran que la unión del 3G4 a FS adsorbida en placas de ELISA fue bloqueado por liposomas preparados a partir de FS, FA, FG y CL, pero que los liposomas preparados a partir de FE y FC no dieron por resultado una reducción detectable en la unión del 3G4 (Fig. 20). Además, los liposomas de EM no fueron inhibidores.

B. Inhibición de la Proliferación Celular

El 3G4 se une a células activadas, en división, dañadas, apoptóticas y malignas que externalizan la FS y otros fosfolípidos aniónicos. El anticuerpo 3G4 inhibe la proliferación de células endoteliales *in vitro* y muestra una inhibición selectiva, marcada, de células endoteliales en división, en lugar de a células inactivas.

Se determine el efecto de los anticuerpos anti-FS, 3G4, 9D2, 3B10, 1B9, 2G7, 7C5 y 3SB en el crecimiento de células bEnd.3 *in vitro.* Las células bEnd.3 (10000/pocillo) se sembraron en placas de 48 pocillos y se permitió que se uniesen. Se añadió DMEM al 20% sólo (control) o DMEM al 20% que contenía los anticuerpos (20 µg a 40 µg de IgG total por pocillo) 4 horas después de efectuar la siembra. Cada clon se evaluó en 2 placas distintas por triplicado. Las células se separaron 48 y 96 horas después, y se determinó el recuento de células en cada pocillo y se calculó el número promedio de células por tratamiento.

Los anticuerpos 3G4 y 9D2 fueron particularmente eficaces, seguido por el 3SB y 3B10, con el 1B9, 2G7 y 7C5 tuvieron menores efectos inhibidores. Cada uno de los anticuerpos mostró una inhibición selectiva de células endoteliales en división (subconfluentes) en vez que células inactivas (confluentes). En estudios comparativos, el 3G4 mostró el efecto inhibidor mayor, seguido del 9D2, cada uno de los cuales fue más inhibidor que el 3SB (Fig. 16).

C. Efectos Antitumorales

El 3G4 se une a la superficie de las células endoteliales vasculares de tumores *in vivo*. Cuando se inyecta por vía intravenosa en ratones que tienen varios tumores el 3G4 se localiza específica y regularmente en el tumor, pero no en los órganos normales. Se observó tinción en el endotelio vascular de tumores (Fig. 22), áreas necróticas y células malignas individuales. Existen múltiples sitios de unión para el 3G4 en los tumores, lo cual permite la localización dirigida simultánea tanto de células de tumores como de células endoteliales de tumores.

El 3G4 suprime la angiogénesis y el crecimiento de tumores *in vivo* y no muestra toxicidad detectable para los órganos, en ratones que tienen tumores. En estudios iniciales, el 3G4 ha mostrado efectos antitumorales impresionantes, en

modelos de tumores singénicos y xenogénicos, en donde el anticuerpo causa daño vascular en el tumor, reduce la vascularidad y la necrosis del tumor (ejemplo XI). Regresiones de tumores establecidos han sido observadas en una cantidad de 30% a 50% de los animales tratados.

Efectos de la localización dirigida antiangiogenica y vascular, representativos, del anticuerpo 3G4, se presentan en la Fig. 17A y en la Fig. 17B, respectivamente. Análisis de secciones de tumores de ratones desnudos que tienen tumores ortotópicos MDA-MB-231, tratados con 3G4, revelaron efectos antiangiogénicos en todos los tumores tratados. La Fig. 17A muestra imágenes representativas de tumores de ratones tratados con 3G4 en contraparte a anticuerpos de control. El tumor de control no muestra signos de necrosis y se encuentra altamente vascularizado, lo cual es demostrado por el marcador de células pan-endoteliales, el CD31, detectado en vasos sanguíneos de tumores (Fig 17A, panel izquierdo). En cambio, tumores de ratones tratados con 3G4 tienen de 80 a 90% de necrosis y casi una desaparición completa de estructuras positivas al CD31, indicando que el tratamiento produjo un efecto antiangiogénico sustancial (Fig 17A, panel derecho).

Otro componente de la actividad anticancerosa del 3G4 es la inducción de daño vascular en el tumor. Esto se ilustra en la Fig. 17B, la cual proporciona imágenes representativas de tumores teñidos con H&E derivados del mismo estudio controlado. Los vasos sanguíneos en los tumores de control se encuentran todos perfundidos, morfológicamente intactos y rodeados por células tumorales en división, viables (Fig. 17B, panel izquierdo). En cambio, los vasos sanguíneos en los animales tratados con 3G4 tienen, según se observa frecuentemente, una capa endotelial en desintegración y son bloqueados por las células endoteliales desunidas y, probablemente, por células huésped que son atraídas a los vasos desnudos (Fig. 17B, panel derecho). El vaso representativo en el tumor tratado con 3G4 muestra claramente pérdida de función, como es indicado por la capa prenecrótica de células tumorales circundantes (Fig. 17B, panel derecho).

En resumen, el examen histológico seguido al tratamiento de tumores MDA-MB-231 ortotópicos usando 3G4 muestra: 1) la desintegración del endotelio vascular en aproximadamente el 50% de vasos en el tumor; 2) la unión de leucocitos al endotelio del tumor y la infiltración de células mononucleares hacia el intersticio del tumor; 3) la oclusión de los vasos del tumor por agregados plaquetarios y glóbulos rojos; 4) una reducción del 70% en la densidad microvascular en tumores de ratones tratados con 3G4 en comparación con ratones no tratados; y 5) necrosis central de los tumores, con supervivencia de un reborde periférico de las células tumorales, típicamente de un ADV. Así, una acción antitumoral primaria del anticuerpo 3G4 es ejercida a través de los efectos en la vasculatura del tumor. Otros mecanismos, particularmente, la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, dirigida contra las células tumorales mismas, contribuye probablemente al efecto antitumoral. Esto es importante, y puede permitir la aniquilación de más células tumorales, incluyendo aquellas que se encuentren en el reborde periférico.

En estudios de seguimiento, el efecto del 3G4 ha sido examinado en otros modelos de murino, incluyendo tumores singénicos (fibrosarcoma Meth A de ratón), xenoinjertos subcutáneos (limfoma de Hodgkin humano L540) y tumores ortotópicos (cáncer de mama MDA-MB-231 humano y cáncer de mama MDA-MB-435 humano). El tratamiento de ratones con el anticuerpo 3G4 dio por resultado un 90%, 65% y 50% y 70% de retardo del crecimiento de estos tumores, respectivamente. Tanto los tumores pequeños (0.1 cm de diámetro) como los tumores bien establecidos (0.3 cm de diámetro, 200 mm^3) fueron inhibidos igualmente. El tratamiento anti-FS indujo remisiones completas a largo plazo en el 50% de ratones que tenían Meth A y 30% de ratones con tumores MBA-MD-231. El 3G4 tiene el efecto inhibidor más alto en ratones inmunocompetentes. Los modelos ortotópicos de tumores de mama humano (MDA-MB-231 y MDA-MB-435), en los cuales se cultivaron tumores de mama humanos en los panículos adiposos mamarios de ratones, son importantes ya que estos son modelos prácticos y reales del crecimiento del cáncer de mama humano en las mamas de los humanos.

D. Perfil de Seguridad

El anticuerpo 3G4 es diferente a los anticuerpos antifosfolípidos descritos en la bibliografía. Típicamente los anticuerpos antifosfolípidos son considerados como anticuerpos patógenos que interfieren con la cascada de coa-gulación. Estos inhiben reacciones de coagulación *in vitro* y causan trombosis *in vivo*. En cambio, los anticuerpos 3G4, 9D2 y similares son anticuerpos terapéuticos sin efectos patógenos.

1. Coagulación

En estudios de coagulación de la sangre *in vitro*, se observó una inhibición débil de la coagulación inducida por el factor tisular (TF) usando altas dosis del anticuerpo 3G4. En otros estudios usando dosis menores, el plasma recalcificado de ratones tratados con 3G4 coaguló a la misma velocidad que el plasma recalcificado de ratones tratados con BBG3 en presencia del factor tisular. También, la adición de 100 µg/ml de 3G4 a células más el factor tisular *in vitro* no afectaron a la velocidad de generación del factor de coagulación Xa en el proplex (ruta de coagulación extrínseca).

A pesar de la débil inhibición de la coagulación inducida por el TF usando altos niveles de anticuerpos *in vitro*, el anticuerpo 3G4 ha sido analizado *in vivo* y no causa complicaciones trombóticas en ratones normales o ratones que tienen tumores (por ejemplover el Ejemplo XI). El anticuerpo 3G4 ha sido analizado también en monos *in vivo* y no se han observado efectos secundarios significativos.

2. Otros Indicadores de Baja o Ninguna Toxicidad

La primera evidencia de que el 3G4 no tiene toxicidad o toxicidada baja, en ratones, provino del descubrimiento de que el 3G4 crece como un hibridoma en ratones sin evidencia de toxicidad. También, cuando se inyecta 1 mg de 3G4 purificado, por vía intraperitoneal, no se observa toxicidad.

Ahora se han realizado estudios sistemáticos *in vivo* en los que grupos de tres ratones BALB/c de 8 semanas fueron inyectados por vía intraperitoneal con 100 µg de 3G4 purificado o con un control de IgG_3 igualado al isotipo (BBG3) tres veces por semana por un tiempo de 2 a 3 semanas. No se han observado signos físicos de toxicidad, y ni se han detectado signos histopatológicos de toxicidad en los órganos o anormalidades morfológicas, en secciones extirpadas de los órganos principales de los ratones tratados con 3G4. Específicamente, se examinaron los siguientes parámetros.

En términos del peso corporal, los ratones tratados con 3G4 ganaron peso a la misma velocidad que los ratones tratados con BBG3. No se observó pérdida de peso en los estudios previos. No hubo signos físicos de toxicidad, por ejemplopérdida de pelo, pérdida de apetito. No hay cambios en los recuentos en las células sanguíneas, incluyendo glóbulos rojos, plaquetas, glóbulos blancos, recuentos absolutos de linfocitos o recuentos absolutos de neutrófilos. Para analizar la celularidad en la médula ósea, secciones de parafina de médula ósea derivadas del 3G4 o ratones tratados con BBG3 (seis inyecciones, 100 µg) fueron examinadas con respecto a la celularidad total y la composición celular. Las médulas óseas en los animales tratados fueron esencialmente celulares en forma completa (como se esperaría para un mamífero joven). Progenitores eritroides, granulocíticos, linfocíticos y megacariocitos se encontraron presentes en números normales.

En resumen no se observó situación de citotoxicidad en más de 200 ratones tratados con altas dosis de 3G4 (0.1 mg) tres veces por semana durante 2-3 semanas. Inclusive cuando se proporcionaron dosis tan altas como de 2 mg, no se observaron signos de toxicidad. Los ratones conservaron sus signos físicos normales, la celularidad de la médula ósea, recuentos celulares de glóbulos blancos de la sangre, histología y funciones de coagulación.

El anticuerpo 3G4 ha sido administrado también a monos en estudios seguros y no se ha observado efectos secundarios.

También se han realizado en ratones estudios cinéticos de eliminación en la sangre. El 3G4 fue radioyodado usando el reactivo de Bolton Hunter y se inyectó por vía intravenosa a ratones (25 g). Se extrajeron muestras de sangre a través de la vena de la cola en varios puntos temporales posteriores. La velocidad de eliminación en la sangre del 3G4 fue típica de una IgG de ratón en el ratón. La semivida en la fase a de la eliminación fue de 3 horas, mientras que en la fase β fue de 5 días. El volumen de distribución fue normal (100 ml/kg). Estos estudios indican que el 3G4 no interactúa con los tejidos normales del huésped, conduciendo a su eliminación acelerada.

E. Efectos Antivirales

El anticuerpo 3G4 ejerce también efectos antivirales significativos. Como se muestra en el ejemplo XIII, el tratamiento de células infectadas con RSV con 3G4 fue superior al efecto observado usando 3SB. Estos resultados resaltan entonces otra ventaja del anticuerpo 3G4 con respecto al anticuerpo anti-FS provinente en la bibliografía, 3SB (Rote *et al.*, (1993)).

También se muestra que el anticuerpo 3G4 es muy eficaz en inhibir el CMV, tanto *in vitro* (ejemplo XII) como en mejorar la supervivencia de ratones infectados con mCMV *in vivo* (ejemplo XXI). Además, se muestra que el anticuerpo 3G4 inhibe la infección del virus Pichinde, el agente infeccioso de la fiebre de Lassa (ejemplo XXIV). La exposición de la FS en la superficie celular como se muestra en la presente memoria , siguiente a una infección viral, y la capacidad del anticuerpo 3G4 para unirse a células infectadas con el virus de la vacuna (ejemplo XXIII), muestran que el anticuerpo 3G4 tiene un enorme potencial como un agente antiviral de amplio espectro.

EJEMPLO XIX

Anticuerpo 3G4, Secuencias CDR y Quimeras

El anticuerpo 3G4 posee entonces las propiedades combinadas de un agente antiangiogénico, antivasculatura en tumores y antiviral. Las actividades inhibitorias de 3G4 en la división celular, la angiogénesis, el crecimiento del tumor y la infectividad, tomadas conjuntamente con falta de toxicidad aparente, muestran amplias indicaciones terapéuticas para este anticuerpo, incluyendo en el tratamiento de trastornos angiogénicos, cáncer, diabetes, e infecciones virales.

Los anticuerpos que reconocen sustancialmente el mismo epítope que el anticuerpo 3G4 pueden ser generados para el uso en una o más de las terapias antiangiogénicas, antivasculatura de tumores y antivirales, por ejemplopor inmunización y confirmada por estudios de competencia de anticuerpos. Los anticuerpos que se unen esencialmente al mismo epítope que al anticuerpo 3G4 pueden ser generados también a partir del conocimiento de las secuencias de

anticuerpos 3G4 proporcionadas en la presente memoria. El presente ejemplo proporciona las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo 3G4 y el uso de la información de la secuencia.

A. Secuencias del Anticuerpo 3G4

Las secuencias originales de las regiones variables del anticuerpo fueron obtenidas por RACE a partir del hibridoma que produce el anticuerpo 3G4 y se verificaron las secuencias. Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (Vh) del anticuerpo 3G4 CDR1-3 se representan por la SECID NO: 1 y SEC ID NO: 2, respectivamente.

La SEC ID NO: 1 y la SEC ID NO: 2 incluyen parte de la secuencia líder de ratón y secuencias de cadena constante, tal como se muestra en la figura 18A. La secuencia líder está representada por aminoácidos del 1 a la 19 de la SEC ID NO: 2, y la proteína madura empieza tal como se muestra mediante la flecha en la figura 18A. Suficiente información de la secuencia de la región determinante de complementariedad, es incluida por la secuencia de la proteína madura hasta la porción de secuencia concluyente VSS, después de lo cual los aminoácidos no son esenciales para la unión al antígeno. Como tal, el sitio BstEII en la secuencia de ácidos nucleicos puede ser usado como un sitio conveniente para preparar una región variable funcional de ratón, por ejemplo, para el uso en el injerto en una región constante humana (figura 18A).
En la práctica, la secuencia 3G4-2BVH ha sido injertada en una región constante humana γ1 en el sitio BstEII usando un vector pEE de Lonza. El producto resultante contiene la secuencia líder de ratón y su VH está unido a la secuencia CH1 humana en la manera mostrada en la figura 18A, en donde ASTLGPSVFPLAPSSKSTSG (SEC ID NO: 7) representa la primera parte de la secuencia CH1 humana.

Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (Vκ) del anticuerpo 3G4 CDR1-3 se representan por la SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4, respectivamente. La SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4 incluyen nuevamente parte de la secuencia líder de ratón y secuencias de cadena constante, tal como se muestra en la figura 18B. La secuencia líder es la de los aminoácidos de la 1 a la 22 de la SEC ID NO: 4, y la proteína madura se empieza mediante la flecha en la figura 18B. Suficiente información de la secuencia de la región determinante de complementariedad es incluida por la secuencia de la proteína madura hasta TVF que concluye la porción de la secuencia, después de lo cual los aminoácidos no son esenciales para la unión al antígeno. Como tal, el sitio BbsI en la secuencia de ácidos nucleicos puede ser usado como un sitio conveniente para preparar una región variable funcional de ratón, por ejemplo, para el uso en el injerto en una región constante humana (figura 18B).

En la práctica, la secuencia 3G4-2BVL ha sido injertada en una región constante humana κ en el sitio BbsI usando un vector pEE de Lonza. El producto resultante contiene la secuencia líder de ratón y su VL está unido con la secuencia CL1 humana en la manera mostrada en la figura 18B, en donde IFPPSDEQLKSGTAS (SEC ID NO: 8) que representa la primera parte de la secuencia de región constante humana κ.

B. Generación y Caracterización del Anticuerpo Quimérico 3G4

La construcción quimérica que contiene las regiones determinantes de la complementariedad de murino y las regiones constantes humanas se han producido (ch3G4) y han demostrado comportarse esencialmente igual que el anticuerpo de murino original.

El anticuerpo 3G4 de murino fue convertido en un anticuerpo quimérico de ratón humano (Avanir (Xenerex) Biosciences, San Diego, CA). El V_h de murino fue clonado e injertado en la región constante humana γ_1 en el sitio BstEII del vector 2BVH de Lonza. El V_k de murino fue clonado e injertado en la región constante K humana en el sitio BbsI del vector 2BVL de Lonza. Las secuencias fueron verificadas. Toda la construcción fue expresada en células CHO y purificada.

El ch3G4 resultante se unió al menos también como el 3G4 de murino, en placas de ELISA recubiertas con fosfolípido. El perfil de unión *in vitro* del 3G4 quimérico, al panel de fosfolípidos, se muestra en la figura 21, en donde se muestra que la unión a FS, AF, CL, FI y FG es similar. La unión fue específico al antígeno dado que no se observó unión con anticuerpos de control de especificidad irrelevante. En ciertos estudios se observó una unión, aparentemente mayor, del 3G4 quimérico contra el anticuerpo 3G4. Esto puede deberse al unión superior del anticuerpo secundario.

In vivo, el ch3G4 se localiza en el endotelio vascular del tumor y ejerce efectos antitumorales. Los efectos antitumorales del ch3G4 en células de cáncer de mama humano MDA-MB-435, creciendo en ratones, se describe en el ejemplo XI, y se muestra en la figura 8G. El tratamiento de los ratones con tumores MDA-MB-435 usando el anticuerpo quimérico, retardó eficazmente el crecimiento del tumor contrario al control.

La localización del ch3G4 se examinó en células de cáncer de mama humano MDA-MB-435, desarrolladas en ratones. Los ratones recibieron una inyección intravenosa de ch3G4 biotinilado o IgG de control de especificidad irrelevante. Una hora después, los ratones se desangraron y sus tumores se extirparon y se cortaron secciones congeladas. Los reactivos biotinilados se incubaron primero con conjugado de estreptavidina-Cy3 se lavaron en PBS y luego se incubaron con el anticuerpo MECA 32 seguido del anticuerpo secundario marcado con FITC. Imágenes individuales,

tomadas con filtros apropiados para fluorescencia de Cy3 (roja) y FITC (verde), respectivamente, fueron capturadas por una cámara digital y transferidas a una computadora. Las imágenes en convergencia que demostraron un color amarillo (un producto de la fusión de la fluorescencia verde y roja) fueron superpuestas con la ayuda del software Metaview.

En este método de doble tinción, las proteínas biotiniladas y el endotelio vascular se marcan en rojo y verde. En donde las proteínas biotiniladas se enlacen al endotelio, la imagen en convergencia aparece amarilla. Como se muestra en la figura 22, el ch3G4 biotinilado se une al endotelio vascular del tumor, porque los patrones de tinción convergen con los del MECA 32.

EJEMPLO XX

Anticuerpo 3G4 en Terapia de Combinación con Docetaxel

El presente ejemplo concierne a terapias de combinación para el tratamiento de tumores usando el anticuerpo 3G4 y el fármaco quimioterapéutico, docetaxel. Estos agentes están designados por atacar las células endoteliales de la vasculatura de los tumores y los compartimientos celulares de los tumores, conduciendo a un tratamiento siner-gístico, con menor toxicidad. Los resultados mostraron que esta terapia de combinación aumentó, en efecto, significativamente la eficacia del tratamiento.

A. Efectos Antitumorales Mediados por el Dominio Fc

El anticuerpo 3G4 fue analizado con respecto a los efectos inhibidores en células de tumores *in vitro*. No se observó efecto inhibidor directo en las células tumorales. Por lo tanto es probable que los efectos antitumorales del anticuerpo 3G4 incluyan el aumento mediado por el dominio Fc de funciones efectoras inmunes, tales como la fagocitosis mediada por el anticuerpo, ADCC, CDC y la estimulación de la producción de citocinas, o estos mecanismos combinados.

Los efectos de la 3G4 en la fagocitosis de células positivas a la FS, por los macrófagos, han sido evaluados. Las células tumorales fluorescentes fueron tratadas con H_2O_2 para inducir exposición a la FS. Después, las células tratadas y no tratadas se recogieron y se pusieron en contacto con el anticuerpo 3G4 o con un anticuerpo de control (BBG). Se añadieron macrófagos de médula ósea de ratón y se analizó la capacidad de los macrófagos para realizar la fagocitosis de las células de tumor fluorescentes, usando un microscopio de fluorescencia.

Se determinó que el 3G4 podría incrementar la fagocitosis de células positivas a la FS por los macrófagos, en más de tres veces (figura 23). Este descubrimiento respalda el razonamiento de los inventores de que el dominio Fc del anticuerpo 3G4 contribuye a los efectos antitumorales del anticuerpo. Es decir, el dominio Fc activa las funciones inmunoefectoras del huésped, que luego ejercen efectos antitumorales. El anticuerpo 3G4 deberá aumentar entonces la actividad lítica de las células NK, conduciendo a una ADCC más eficaz.

B. El Docetaxel Induce la Exposición de la FS en las Células Endoteliales

La inducción de la FS en las células endoteliales mediante concentraciones subclínicas de docetaxel fue examinada *in vitro* mediante el análisis FACS. Células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC) y células endoteliales de microvasos humanas (HMVEC) fueron tratadas con 10 nM de docetaxel durante 24 horas y se examinaron mediante FACS. Ambas HUVEC y HMVEC tratadas mostraron un incremento significativo en la unión del 3G4 en comparación con las células no tratadas (figura 24A y figura 24B, respectivamente). También se llevaron a cabo incubaciones con docetaxel por 48 y 72 horas.

C. El Docetaxel Induce la Exposición de la FS en las Células Tumorales

La inducción *in vitro* de la exposición de la FS mediante concentraciones subclínicas de docetaxel fue examinada también mediante el análisis FACS usando un panel de líneas celulares de tumores. Carcinoma de pulmón de Lewis de Ratón 3LL, carcinoma de colon de ratón Colo 26 y células MDA-MB-435 de cáncer de mama humanas fueron tratadas con 10 nM de docetaxel durante 24 horas y examinadas mediante FACS. Todas las líneas celulares de tumores, analizadas, mostraron un incremento significativo en la unión del 3G4 en comparación con las células no tratadas (figura 25A, figura 25B y figura 25C, respectivamente). También se llevó a cabo incubaciones con docetaxel por 48 y 72 horas. Líneas celulares de tumores de melanoma B16 de ratón y fibrosarcoma Meth A de ratón fueron examinadas adicionalmente y mostraron también un unión significativo en la unión del 3G4 en comparación con las células no tratadas.

Células MDA-MB-231 de cáncer de mama humanas fueron tratadas con 10 nM de docetaxel durante 24 horas e incubadas ya sea con el anticuerpo 3G4 quimérico (ch3G4) o con el control, IgG humana y fueron analizadas mediante FACS. Estos resultados muestran que el incremento significativo en la unión del anticuerpo es específico al antígeno y que el anticuerpo quimérico se comporta como el anticuerpo 3G4 original (figura 26).

D. Tratamiento Sinérgico de Tumores con 3G4 y Docetaxel

Los inventores han demostrado entonces que el tratamiento de células endoteliales y células tumorales con docetaxel, a una concentración subclínica, incrementa significativamente la unión del 3G4. También han demostrado que el anticuerpo 3G4 facilita la fagocitosis de células tumorales, mediada por los macrófagos, sobre las cuales se encuentra expuesta la FS en la superficie. La unión del 3G4, incrementado, mediado por el docetaxel, deberá aumentar entonces la fagocitosis de las células tumorales y otros efectos antitumorales mediados por el dominio Fc del anticuerpo 3G4, tal como el incremento de la actividad lítica de las células NK, conduciendo a una ADCC más eficaz. Estudios de otros han demostrado también que el tratamiento de pacientes con cáncer de mama, con doceta- xel, conduce a un incremento de los niveles de citocinas en suero IFN-y, IL-2, IL-6 y GM-CSF y han aumentado la actividad de las células NK y LAK (Tsavaris *et al.*, 2002).

El efecto antitumoral de la terapia combinada del 3G4 con docetaxel fue examinado entonces en un modelo ortotópico en ratones SCID que tenían carcinoma de mama MDA-MB-435 humano. Ratones que tenían tumores de mama, ortotópicos, MDA-MB-435, humanos, fueron tratados por vía intraperitoneal sólo con el 3G4 (100 µg/dosis), docetaxel solo (10 mg/kg), o 3G4 en combinación con docetaxel (100 µg/dosis y 10 mg/kg, respectivamente), por tres semanas, con una administración de 3 veces por semana. El tratamiento empezó 6 días después de la implantación de las células tumorales.

Estos estudios mostraron que la terapia combinada del 3G4 más el docetaxel, dio por resultado una inhibición de 90% en el crecimiento. La inhibición del crecimiento del 3G4 más el docetaxel, fue significativamente superior al 3G4 solo ($p < 0.005$) y con el docetaxel solo ($p < 0.01$).

E. Localización dirigida del 3G4 de Células Tumorales Apoptóticas al FcyR en Células Dendríticas

Tumores de ratones tratados con 3G4 más docetaxel, contenían también una cantidad inusual de linfocitos, en comparación con los tumores de control. Aunque este fenómeno podría representar la quimioatracción típica de células inmune por células de tumor en desintegración, podría reflejar también la activación del sistema inmune por el 3G4 mediado a través de la unión del Fc al FcyR en células efectoras inmunes.

Para caracterizar los efectos del 3G4 y administración de docetaxel en un infiltrado de células inmunes, intratumorales, los tipos de células presentes en estos infiltrados pueden ser identificados por inmunotinción de secciones congeladas y/o secciones en parafina de tejidos de tumores, usando anticuerpos dirigidos contra marcadores específicos de macrófagos, neutrófilos, granulocitos, células NK y linfocitos activados (Pharmingen, San Diego, CA). El grado, fenotipo, y estado de activación de este infiltrado puede ser calificado. La producción de citocinas por células inmunes infiltrantes, incluyendo IL-2 e INF, puede analizarse también a través de técnicas de inmunohistoquímica. Los niveles de citocinas en suero pueden evaluarse por ELISA y la tinción intracelular puede usarse para identificar los compartimientos celulares específicos responsables de la producción de citocinas. Por tanto, los efectos de las células inmunes infiltrantes, en la proliferación y apoptosis de las células tumorales, pueden evaluarse sistemáticamente.

En vista de los datos anteriores, los inventores contemplan además métodos que aumentan la potencia de la inmunoterapia del cáncer de mama mediante la localización dirigida mediada por el 3G4, de células tumorales apoptóticas, al receptor gamma Fc (Fc(γ)R) en células dendríticas. La presentación al antígeno eficiente, que induce las respuestas inmunes celulares y humorales, eficaces, es importante para el desarrollo de vacunas e inmunoterapias contra tumores. Las células dendríticas (CD) son las células presentadoras de antígeno (APC) más potentes que ceban linfocitos T citotóxicos contra antígenos asociados con tumores. La mejora de la presentación del antígeno en tumores mediante las células dendríticas (CD) conduciría a desarrollar vacunas más potentes contra tumores.

La presentación antigénica mediante la internalización de las CD mediada por el receptor Fc(γ)R, puede aumentarse hasta 1.000 veces en comparación con la pinocitosis del antígeno en fase fluida. Las células tumorales apoptóticas (ATC) son una excelente fuente de antígenos para la carga de células dendríticas, porque múltipes antígenos específicos para el tumor (tanto conocidos como desconocidos) pueden ser presentados eficientemente en células T de naüve, haciendo que la presencia de variantes de escape inmune sea menos probable debido al bloqueo de ciertos epítopes. En estudios realizados en animales, las CD sometidas a impulsos con ATCs han demostrado producir una potente inmunidad antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, datos recientes han demostrado que las ATC solas fueron algo ineficientes para activar la inmunidad antitumoral, posiblemente por su insuficiente captación e incapacidad para inducir la maduración de las CD.

Estudios recientes han demostrado también que el complejo inmune de ATC formado por la unión del anticuerpo antitumoral a las células tumorales apoptóticas, puede ser dirigido al Fc(γ)R sobre la CD. En comparación con las ATC solas, los complejos inmunes de ATC fueron internalizados más eficientes por la CD, fueron más oficientes en la inducción de la activación y maduración de las CD, y de manera más importante, los complejos inmunes de ATC pueden aumentar significativamente la presentación del antígeno I-restringido y II-restringido por la MHC, induciendo entonces una potente inmunidad CTL y célula auxiliar T antitumoral.

Los inventores de la presente contemplan entonces el uso de los anticuerpos anti-FS, de la invención, para aumentar la inmunidad antitumoral tanto hormonal como celular, y reforzar la eficacia de las vacunas para tumores en CD basadas en ATC. Como la FS es un marcador universal, y el más abundante, de las células tumorales apoptóticas, el

panel de anticuerpo de la invención, particularmente el 3G4, puede unirse a la FS sobre las ATC. Los inventores han demostrado ya que el 3G4 puede aumentar la captación de CD de las células tumorales apoptóticas en un 300% a través de la internalización de complejo de 3G4-ATC, mediada por Fc(γ)R. Al aumentar la captación de ATC por CD mediada por Fc(γ)R, se razona entonces que el 3G4 y anticuerpos similares pueden aumentar en gran medida la presentación al antígeno tanto I como II restringida por la MHC, inducir una potente inmunidad antitumoral, tanto hormonal como celular, y reforzar la eficacia de las vacunas para tumores CD en base a la ATC. Esto puede ser demostrado al establecer la eficacia de la CD cargada con complejos inmunes 3G4-ATC en la inducción de la respuesta de la T H1, CTL y del anticuerpo, *in vivo*, y determinando la potencia de la inmunidad antitumoral inducida por la inmunización de CD cargada con complejos inmunes 3G4-ATC *in vivo*.

EJEMPLO XXI

Los Anticuerpos Anti-FS Tratan Infecciones por CMV In Vivo

Después de los efectos antivirales el CMV *in vitro* mostrados en el ejemplo XII, el presente ejemplo demuestra la supervivencia aumentada de ratones infectados con la versión del virus CMV en murino, el mCMV.
Ratones Balb/C (de 6 semanas, cinco ratones por grupo) fueron infectados por vía intraperitoneal con 5 x 10^5 ufp de mCMV RVG102. Los ratones fueron tratados por vía intraperitoneal en el día 1 con el anticuerpo 3G4 (1 mg/ratón), o el anticuerpo quimérico de humano-ratón, ch3G4 descrito anteriormente (1 mg/ratón). Los ratones no tratados sirvieron como el control. Los ratones fueron tratados cada cuatro días después con 0.5 mg/ratón de anticuerpo o anticuerpo quimérico hasta el día 26. La supervivencia de los ratones se monitorizó 90 días después de la infección.

El tratamiento con las formas tanto originales como quiméricas, del anticuerpo 3G4, dio por resultado una supervivencia de los ratones infectados por mCMV. Los ratones tratados con 3G4 o ch3G4 tuvieron 100% y 80% de supervivencia, respectivamente, en comparación con los ratones no tratados, en donde sólo el 25% de los ratones sobrevivieron a la infección (figura 27).

EJEMPLO XXII (ejemplo de referencia)

El Derivado de Péptido de Unión a la FE Trata la Infección por CMV In Vivo

Además de los efectos antivirales *in vitro* contra el CMV, mostrados en el ejemplo XVII, este ejemplo muestra que el derivado de duramicina-biotina, DLB, incrementó la supervivencia de ratones infectados con mCMV.

Ratones Balb/C (de 6 semanas, cinco ratones por grupo) fueron infectados por vía intraperitoneal con 5 x 10^5 ufp de mCMV RVG102. Los ratones fueron tratados por vía intraperitoneal el día 1 y cada cuatro días con 20 µg/ratón del derivado de duramicina, DLB. Los ratones sin tratar sirvieron como el control. La supervivencia de los ratones se monitorizó después de 90 días de la infección.

El tratamiento con el derivado de duramicina-biotina, DLB, aumentó la supervivencia de los ratones infectados con mCMV. Los ratones tratados con DLB tuvieron un 100% de supervivencia, en comparación con los ratones no tratados, en donde sólo el 25% de los ratones sobrevivieron a la infección (figura 28).

EJEMPLO XXIII

Los Anticuerpo Anti-FS se unen a Células Infectadas Viralmente

El presente ejemplo muestra que la infección viral induce la exposición de la FS en la superficie celular y que los anticuerpos anti-FS se unen a células infectadas viralmente. Las células infectadas con el virus de la vacuna se vuelven positivas a la FS, tal como lo muestra la unión incrementado del anticuerpo 3G4 quimérico a la superficie celular demostrado en los análisis mediante FACS.

Células U937 fueron infectadas con virus de la vacuna tratado con tripsina con una m.o.i alta de 2. Brevemente, el virus de la vacuna fue tratado con un volumen igual de 0.25 mg/ml de tripsina durante 30 minutos a 37°C. El virus se añadió a células U937 en un volumen total de 0,5 ml. Después de 1,5 horas se añadió medio reciente a las células y se incubaron en un matraz T25 a 37°C durante 2 días. Las células no infectadas sirvieron como controles.

Las células U937, infectadas y no infectadas, fueron teñidas con un anticuerpo primario, ya sea con el anticuerpo 3G4 quimérico (ch3G4) o con IgG humano (HIgG) como un control. Las células se lavaron, se bloquearon con suero de ratón normal y luego se tiñeron con el anticuerpo primario por 45 minutos sobre hielo. Después de tres lavadas las células fueron teñidas con una dilución de 1:400 de anticuerpo secundario conjugado a FITC antihumano de cabra y fueron analizados en un FACScan.

Los resultados de los análisis de FACS muestran que existe un desplazamiento significativo con el ch3G4 en células U937 infectadas con el virus de la vacuna (figura 29B, pico derecho (verde)), en comparación con el obtenido en células U937 no infectadas (figura 24A, pico derecho (verde)). Este estudio muestra entonces que la infección de

células con el virus de la vacuna conduce a la exposición de FS en la superficie celular y que la versión quimérica del anticuerpo anti- FS, el 3G4, puede unirse a estas células infectadas viralmente.

EJEMPLO XXIV

Efectos Antivirales de Anticuerpos Anti-FS contra el Virus Pichinde

Además de los efectos antivirales contra el CMV y RSV, el presente ejemplo muestra además que los anticuerpos anti-FS inhiben la infección por el virus Pichinde *in vitro*. El virus Pichinde es un arenavirus del Nuevo Mundo, el cual no es patógeno en el hombre y se usa en un modelo animal para la fiebre de Lassa.

Monocapas confluentes de células Vero fueron tratadas con el anticuerpo 3G4 o un anticuerpo de control igualado al isotipo, GV39G, después de la infección con el virus Pichinde a una multiplicidad de infección (m.o.i.) baja de 0.01 ufp/célula. Brevemente las células fueron incubadas con virus en un volumen total de 1 ml por pocillo a 37°C durante 90 minutos. Durante la infección las placas fueron agitadas suavemente con movimiento oscilante cada 30 minutos. Después de la infección, el sobrenadante de las células se retiró y se añadió DMEM/10% de FBS/pen-estrep, a cada pocillo (2 ml por pocillo). El día 2 las células se recogieron con tripsina y se les dejó adherirse a portaobjetos de cámara Biocoat. Estas se fijaron y tiñeron con suero anti-PIC de conejo policlonal, seguido de un anticuerpo secundario anticonejo de cabra conjugado con biotina (el anticuerpo secundario solo no produjo tinción, tal como muestra la figura 30C). Se contó el número de células infectadas por campo de 100 células.

En las células tratadas con 3G4, el virus está restringido a las células individuales que se tiñeron de un color rojo oscuro, contando aproximadamente una en aproximadamente cien células (figura 30A). Estas son probablemente las células que estaban originalmente infectadas por el virus, como se observó con el CMV (Ejemplo XII). Sin embargo, en las células tratadas con el control, el anticuerpo GV39G, el virus se había diseminado y había afectado a todas las células (figura 30B).

Este patrón de inhibición de la replicación viral es similar al que se observó cuando se usó 3G4 para tratar fibroblastos humanos infectados por el CMV. De esta manera, el anticuerpo anti-FS, el 3G4, previene eficazmente la diseminación del virus Pichinde, de célula a célula, como se cuantifica en la figura 30D.

EJEMPLO XXV (ejemplo de referencia)

Tratamiento de Tumores Usando Derivados de Péptidos de Unión a la FE

Además de los efectos antivirales de los derivados de duramicina, tanto *in vitro* como en *in vivo*, el presente ejemplo muestra la localización de los derivados de duramicina en la vasculatura del tumor y efectos antitumorales asociados.

A. Tratamiento de Tumores con el Conjugado de Duramicina-HuIgG

IgG humana (HIgG) fue purificada primero como se describió en el ejemplo XV. La HIgG purificada fue unida a duramicina usando el enlazador SIAB, y el conjugado de (D-SIAB)nHIgG, resultante, se purificó.

La línea celular de fibrosarcoma de ratón MethA se cultivó, se recogió en la fase logarítmica y volvió a suspenderse en DPBS. Aproximadamente 10^6 células tumorales MethA se inyectaron por vía subcutánea en el dorso medio de ratones BALB/c macho, de 6 a 8 semanas de vida. 5 días después del implante, los ratones se separaron aleatoriamente en dos grupos (n=15). A partir del día 10, un grupo recibió 150 µg del conjugado de Duramicina- HuIgG, mediante inyección intraperitoneal por 2 semanas consecutivas. El otro grupo recibió la misma cantidad de HuIgG como un control. Los volúmenes de los tumores se midieron dos veces por semana y se calcularon usando la fórmula $1/2\ ab^2$, (donde "a" es el eje longitudinal y "b" el eje transversal corto del tumor). Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 1400 mm^3 aprox.

El conjugado de duramicina-HIgG inhibió el crecimiento del tumor MethA en ratones BALB/c a una dosis de 150 µg/día, en comparación con la IgG humana de control (fig. 31).

B. El Conjugado de Duramicina HuIgG se Localiza en la Vasculatura de Tumores

Usando el mismo modelo de tumor de ratón MethA anterior, cuando el tamaño del tumor alcanzó 500 mm^3, 100 µg de $(D\text{-}SIAB)_n$HIgG en 100 µl de PBS, se inyectaron a través de la vena de la cola. La misma cantidad de IgG humana se inyectó como un control. Después de 4 horas se practicó la eutanasia a los ratones y se perfundieron con solución salina normal durante 5 minutos y 1% de paraformaldehído por 10 minutos. El tumor y otros órganos principales se disecaron y congelaron en nitrógeno líquido. Después de la inclusión en OCT, el tejido se seccionó criogénicamente en una sección de 10 µm y se colocó sobre portaobjetos tratados con silano. Después de la fijación en acetona fría durante 10 minutos, los portaobjetos se tiñeron con IgG antihumana de cabra marcada con peroxidasa para detectar la biodistribución de la duramicina-HuIgG. Se usaron IgG antirata de cabra, marcada con peroxidasa, y MECA 32, para detectar la vasculatura sanguínea del tejido.

Este estudio mostró que el conjugado de duramicina-HIgG se localizó en la vasculatura del tumor en los animales tratados.

EJEMPLO XXVI (ejemplo de referencia)

Biodistribución y Propiedades de los Conjugados de Duramicina

El presente ejemplo muestra la falta de toxicidad de los derivados de duramicina impermeables a la célula *in vitro*, la biodistribución de los derivados de duramicina administrados *in vivo* y la capacidad de los conjugados de duramicina-anticuerpo, para incrementar la fagocitosis de células apoptóticas por parte de los macrófagos.

A. Los conjugados de Duramicina-Biotina no son Citotóxicos

Los derivados y conjugados de duramicina, de la invención, están diseñados para minimizar los efectos tóxicos no específicos de la molécula de duramicina relacionada. En muchos ejemplos esto se consigue uniendo la duramicina a un grupo impermeable a la célula (ejemplo XV).

La construcción de duramicina biotinilada DLB se preparó como se describió en el ejemplo XV. El compuesto de duramicina no modificado y DLB se analizaron con respecto a los efectos citotóxicos en HUVEC usando un ensayo MTT. Aunque la duramicina no modificada mostró una toxicidad dependiente de la dosis, el DLB no fue tóxico, igualando al control no tratado (figura 32).

B. Localización del Conjugado de Duramicina-Biotina a Macrófagos en Pulmón

Se cultivó la línea celular de cáncer de mama humana MDA-MB-435, se recogió en la fase logarítmica, y volvió a suspenderse en DPBS. Aproximadamente 10^7 células se inyectaron en el panículo adiposo mamario de ratones desnudos atímicos hembra, de 6 a 8 semanas de vida. 100 µg de duramicina-biotina en 100 µl de PBS fueron inyectados a través de la vena de la cola. Después de 4 horas los ratones fueron sometidos a eutanasia y se perfundieron con solución salina normal durante 5 minutos y 1% de paraformaldehído por 10 minutos. Los órganos principales, incluyendo el corazón, pulmones, hígado, riñones, cerebro, intestinos, testículos y bazo se disecaron y se congelaron en nitrógeno líquido. Después de incluirse en OCT, el tejido se seccionó criogénicamente en secciones de 10 µm y se colocaron sobre portaobjetos tratados con silano. Después de la fijación en acetona fría por 10 minutos, los portaobjetos se ti- ñeron con estreptavidina marcada con Cy3 para detectar la biodistribución del construcción de duramicina-biotina. IgG antirata de cabra, marcada con MECA 32 y FITC se usaron para detectar la vasculatura sanguínea del tejido.

La inyección intravenosa del conjugado de duramicina-biotina a ratones desnudos que tenían tumores MDA-MB- 435 dio por resultado la deposición del fármaco en las células tumorales, túbulos renales y en los macrófagos en el pulmón. Hubo una mínima deposición en el hígado y no hubo distribución detectable en el cerebro, intestinos, y testículos. La localización de los macrófagos en el pulmón puede ser explotada en los ambientes antivirales de la invención.

C. El Conjugado de Duramicina-Anticuerpo Aumenta la Fagocitosis de las Células Apoptóticas

La capacidad del conjugado-anticuerpo (duramicina-C44, DuC44) para incrementar la fagocitosis de células apoptóticas se investigó después.

Los macrófagos fueron aislados y cultivados a partir de la médula ósea de ratón. El medio usado para el aislamiento, cultivo, y estimulación de los macrófagos BM fue DMEM que contenía glutamina 2 mM, $NaHCO_3$ al 0,37% (p/v), FCS al 10% (v/v) termoinactivado, y 0,5 ng/ml de GM/CSF de ratón. Las células de la médula ósea se lavaron a chorro asépticamente a partir de los fémures disecados, con un chorro de medio completo dirigido a través de una aguja calibre 25. Las células se ajustaron después hasta una densidad de aproximadamente 3 x 10^5 células/ml del medio completo, y fueron distribuidas en alícuotas de 0.5 ml en portaobjetos de cámara de 8 pocillos.

Las células fueron incubadas durante 1 hora a 37°C en 5% CO2, en una cámara humidificada para permitir que los macrófagos se adhirieran y diseminaran. Las células no adherentes se eliminaron añadiendo 5 ml de PBS caliente a cada pocillo, volviendo a suspender las células no adherentes inundando moderadamente la placa y golpeteando los portaobjetos para descartar las células no adherentes. Este lavado se realizó un total de tres veces. Las células se mantuvieron a 37°C a una atmósfera del 7,5% (v/v) de CO_2 durante 5 días. El medio completo fue cambiado cada tercer día hasta que se usaran las células.

El método siguiente se usó para marcar células diana HL-60 con un trazador de células fluorescentes. Se preparó una solución concentrada de CFDA SE, 10 mM, inmediatamente antes del uso, disolviendo el contenido de un vial de colorante 90 µl del DMSO y diluyendo en PBS hasta 10 µM. Se usó centrifugación para obtener el sedimento de células HL-60 y se aspiró el sobrenadante. Las células volvieron a suspender en CFDA/PBS y se incubaron a 37°C por 15 minutos. Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se aspiró. Las células se volvieron a suspender en el medio y se incubaron por otros 30 minutos. La viabilidad de las células y fluorescencia de las mismas fueron confirmadas como mayores del 95%.

En este ensayo de fagocitosis, las células marcadas con HL-60 fueron expuestas a 254 nm de UV durante 5 minutos y se incubaron a 37°C durante una hora para inducir apoptosis. 10^4 células HL-60 apoptóticas, fueron incubadas con macrófagos durante una hora. El conjugado de duramicina-C44 se incluyó a una concentración de 10 µg/ml. Se uso la misma concentración del anticuerpo de ratón BBG3 como un control negativo, y el anticuerpo 3G4 se incluyó también para comparación. Se añadió Hoechst 33342 en el medio en los últimos 45 minutos a una concentración de 10 µg/ml.

Los portaobjetos se lavaron con PBS 3 veces y se fijaron en paraformaldehído al 4% por 15 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con anticuerpo CD11 antiratón de rata (CD11 es un marcador de macrófago), se diluyeron en gelatina al 0,2% durante una hora, se lavaron y se tiñeron con anticuerpo secundario antirata de cabra marcado con rojo Texas.

Las células de analizaron al microscopio de fluorescencia. Los macrófagos se identifican como células rojas, debido al marcador CD11. Los macrófagos que han realizado la fagocitosis en células apoptóticas son identificados como células verdes, debido al trazador de fluorescencia que se encuentra en las células diana. Las células rojas y verdes fueron contadas y se cuantificó la fagocitosis como el porcentaje de fagocitos positivos para la captación.

Este estudio muestra que el conjugado de duramicina-anticuerpo, DuC44, aumentó la fagocitosis de células HL- 60 apoptóticas por los macrófagos (figura 33). De esta manera la porción de duramicina se une a la superficie de las células apoptóticas, permitiendo que la porción protuberante de anticuerpo, del conjugado, sea reconocida por los macrófagos. El conjugado de duramicina-anticuerpo funcionó entonces de forma similar que el anticuerpo 3G4. Como se esperaba, un fragmento $(Fab)_2$ del anticuerpo 3G4, que carecía de la región Fc, no indujo fagocitosis por arriba de los niveles de control.

Ya que el estudio anterior mostró que los conjugados de duramicina-biotina se localizan en los macrófagos en el pulmón seguido a la administración *in vivo*, la estimulación de la fagocitosis de células apoptóticas, mediada por el macrófago, presentada en este estudio, tiene importantes implicaciones para los usos terapéuticos de la invención, tales como el tratamiento de infecciones virales pulmonares.

A la vista de la presente descripción, todas las composiciones y métodos descritos y reivindicados en este documento pueden ser realizarse y ejecutarse sin excesiva experimentación.

REFERENCIAS

Las siguientes referencias proporcionan procedimientos ejemplares u otros detalles complementarios a los presentados en esre documento.

Abrams y Oldham, In: Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer, Foon and Morgan (Eds.), Martinus NijhoffPublishing, Boston, pp. 103-120, 1985.

Adler, Ng, Rote, "Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR", Biol. Reprod., 53(4):905-910, 1995.

Alving, Banerji, Fogler and Alving, "Lupus anticoagulant activities of murine monoclonal antibodies to liposomal phosphatidylinositol phosphate", Clin. Exp. Immunol., 69:403-408, 1987.

Andree, Reutelingsperger, Hauptmann, Hemker, Hermens, Willems, "Binding of vascular anticoagulant α (VACa) to planar phospholipid bilayers", J. Biol. Chem., 265:4923-4928, 1990.

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Aoki, Uenaka, Aoki, Umeda and Inoue, "A Novel Peptide Probe for Studying the Transbilayer Movement of Phosphatidylethanolamine", J. Biochem., 116:291-297, 1994.

Asano, Yukita, Matsumoto, Kondo, Suzuki, "Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutra- lizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor", Cancer Res., 55:5296-5301, 1995.

Baca *et al.*, "Antibody humanization using monovalent phage display", J. Biol. Chem., 272(16):10678-84, 1997.

Barbas, Kang, Lerner, Benkovic, "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site", Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88(18):7978-7982, 1991.

Barbas *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:4457-4461, 1992.

Barras, Bain, Hoekstra and Lerner, "Semisynthetic Combinatorial Antibody Libraries: A Chemical Solution to the Diversity Problem", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461, 1992.

Berman, Mellis, Pollock, Smith, Suh, Heinke, Kowal, Surti, Chess, Cantor, *et al.*, "Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VU families and linkage to the Ig CH locus", EMBO J., 7(3):727- 738, 1988.

Bevers, Rosing, Zwaal, "Development of procoagulant binding sites on the platelet surface", Adv. Exp. Med. Biol., 192:359-371, 1985.

Bevilacqua, "Endothelial-leukocyte adhesion molecules", Ann. Rev. Immunol., 11:767-804, 1993.

Bitbol, Fellmann, Zachowski, Devaux, "Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes", Biochim. Biophys. Acta, 904(2):268-282, 1987.

Blackwood y Ernst, "Characterization of Ca2(+)-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins", Biochem. J., 266(1):195-200, 1990.

Blankenberg, Katsikis, Tait, Davis, Naumovski, Ohtsuki, Kopiwoda, Abrams, Darkes, Robbins, Maecker, Strauss, "*In vivo* detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death", Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95(11): 6349-6354, 1998.

Bocci, "Efficient labeling of serum proteins with 131I using chloramine T", Int. J. Appl. Radiat. Isot., 15:449-456, 1964.

Bombeli, Karsan, Tait, Harlan, "Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant", Blood, 89(7):2429-2442, 1997.

Borgstrom *et al.*, "Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by antivascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy", Cancer Res, 56(17):4032-1439, 1996.

Borgstrom et al, "Neutralizing antivascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors *in vivo*", Prostate, 35(1):1-10, 1998.

Bornstein, "Thrombospondins: structure and regulation of expression", FASEB J, 6(14):3290-3299, 1992.

Borrebaeck y Moller, "*In vitro* immunization. Effect of growth and differentiation factors on antigen-specific B cell activation and production of monoclonal antibodies to autologous antigens and weak immunogens", J. Immunol., 136(10):3710-3715, 1986.

Boustead, Brown, Walker, "Isolation, characterization and localization of annexin V from chicken liver", Bio- chem. J, 291: 601-608, 1993.

Boyle, Pohlman, Cornejo, Verrier, "Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion", Ann. Thor. Surg., 62(6):1868-1875, 1996.

Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Anal Biochem., 72:248-254, 1976.

Branch, Rote, Dostal, Scott, "Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine", Clin. Immun. Immunopathol, 42:63-75, 1987.

Brem, "Angiogenesis antagonists: current clinical trials", Angiogenesis, 2:9-20, 1998.

Bresnahan, Boldogh, Thompson y Albrecht, "Human Cytomegalovirus inhibits cellular ADN synthesis and arrests productively infected cells in late G1", Virology, 224:150-160, 1996.

Bruijn and Dinklo, "Distinct patterns of expression of intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 in renal disease", Lab. Invest., 69:329-335, 1993.

Burke *et al.*, "Cloning of large segments of exogenous ADN into yeast by means of artificial chromosome vectors", Science, 236, 806-812, 1987.

Burrows, Watanabe, Thorpe, "A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors", CancerRes, 52:5954-5962, 1992.

Burrows y Thorpe, "Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:8996-9000, 1993.

Calderon y DeVries, "Lipid composition and phospholipid asymmetry of membranes from a schwann cell line", J. Neuro. Res., 49:372-380, 1997.

Callahan *et al.*, J. Immunol, 170:4840-4845, 2003.

Campbell, In: Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg (Eds.), Elseview, Amsterdam, pp. 75-83, 1984.

Carnemolla *et al.*, "A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors", J. CellBiol., 108:1139-1148, 1989.

Cheng, Huang, Nagane, Ji, Wang, Shih, Arap, Huang, Cavenee, "Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:8502-8507, 1996.

Choung, Kobayashi, Inoue, Takemoto, Ishitsuka e Inoue, "Hemolytic Activity of a Cyclic Peptide Ro09- 0198 Isolated from Streptoverticillium", Biochim. Biophys. Acta., 940:171-179, 1988a.

Choung, Kobayashi, Takemoto, Ishitsuka e Inoue, "Interaction of a Cyclic Peptide, Ro09-0198, with Phosphatidylethanolamine in Liposomal Membranes", Biochem. Biophys. Acta, 940:180-187, 1988b.

Christiansen, Sims, Hamilton, "Complement C5b-9 increases plasminogen binding and activation on human endothelial cells", Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol, 17(1):164-171, 1997.

Clapp *et al.*, "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis", Endocrinology, 133(3):1292-1299, 1993.

Comfurius, Senden, Tilly, *et al.*, "Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase", Biochim. Biophys. Acta., 1026(2):153-160, 1990.

Coughlin *et al.*, "Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis", J. Clin. Invest, 101(6): 1441-1452, 1998.

Dachary-Prigent, Toti, Satta, Pasquet, Uzan, Freyssinet, "Physiopathological significance of catalytic phospholipids in the generation of thrombin", Seminars In Thrombosis and Hemostasis, 22:157-164, 1996.

D'Amato *et al.*, "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(9):4082-4085,1994.

D'Angelo *et al.*, "Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(14):6374-6378, 1995.

Daum, "Lipids of mitochondria", Biochim. Biophys. Acta, 822(1):1-42, 1985.

Davis and Yancopoulos, "The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis", Curr. Top. Microbiol. Immunol., 237:173-85, 1999.

Demo, Masuda, Rossi, *et al.*, "Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytomeric annexin-V binding assay", Cytometry, 36(4):340-348, 1999.

Denekamp, "Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer", Cancer Metastasis Rev., 9:267-282, 1990.

Devaux, "Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry", Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 21:417439, 1992.

DeVore et al, "Phase I Study of the Antineovascularization Drug CM1O1", Clin. CancerRes., 3(3):365-372, 1997.

Diehl, Pfreundschuh, Fonatsch, Stein, Falk, Burrichter, Schaadt, "Phenotypic genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications", Cancer Surveys, 4:399-416, 1985.

Dillon, Mancini, Rosen, *et al.*, "Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation", J. Immunol., 164(3):1322-1332, 2000.

Donati y Falanga, "Pathogenic mechanisms of thrombosis in malignancy", Acta Haematol., 106(1-2):18-24, 2001.

Drouvalakis and Buchanan, "Phospholipid specificity of autoimmune and drug induced lupus anticoagulants; association of phosphatidylethanolamine reactivity with thrombosis in autoimmune disease", J. Rheumatol., 25(2):290- 295, 1998.

Droz, Patey, Paraf, Chretien, Gogusev, "Composition of extracellular matrix and distribution of cell adhesion molecules in renal cell tumors", Lab. Invest., 71:710-718, 1994.

Dvorak, Nagy, Dvorak, "Structure of Solid Tumors and Their Vasculature: Implications for Therapy with Monoclonal Antibodies", Cancer Cells, 3(3):77-85, 1991.

Edgington, Mackman, Brand, Ruf, "The Structural Biology of Expression and Function of Tissue Factor", Th- romb. Haemost., 66(1):67-79, 1991.

Emoto, Kobayashi, Yamaji, Aizawa, Yahara, Inoue y Umeda, "Redistribution of Phosphatidylethanolamide at the Cleavage Furrow of Dividing Cells During Cytokinesis", Proc. Natl. Acad. Sci., 93:12867-12872, 1996.
Emoto, Toyama-Sorimachi, Karasuyama, Inoue y Umeda, "Exposure of Phosphatidylethanolamine on the Surface of Apoptotic Cells", Exp. Cell Res., 232:430-434, 1997.

Ferrara, Clapp, Weiner, "The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells", Endocrinology, 129(2): 896-900, 1991.

Ferrara, "The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis", Breast CancerRes. Treat., 36:127-137, 1995.

Folkman *et al.*, "Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone", Science, 221:719-725, 1983.

Fotsis *et al.*, "The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth", Nature, 368(6468):237-239, 1994.

Frater-Schroder *et al.*, "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth *in vitro*, is angiogenic *in vivo*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84(15):5277-5281, 1987.

Frazier, "Thrombospondins", Curr. Opin. Cell Biol., 3(5): 792-799, 1991.

Fridrikksson, Shipkiva, Sheets, Holowka, Baird y McLafferty, "Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrome- try:", Biochemistry, 38: 8056-8063, 1999.

Fries, Williams, Atkins, Newman, Lipscomb, Collins, "Expression of VCAM-1 and E-selectin in an *in vivo* model of endothelial activation," Am. J. Pathol., 143:725-737, 1993.

Gaffet, Bettache, Bienvenüe, "Transverse redistribution of phospholipids during human platelet activation: evidence for a vectorial outflux specific to aminophospholipids", Biochem., 34: 6762-6769, 1995.

Gagliardi, Hadd, Collins, "Inhibition of angiogenesis by suramin", Cancer Res., 52(18):5073-5075, 1992.

Gagliardi y Collins, "Inhibition of angiogenesis by antiestrogens", Cancer Res., 53(3):533-535, 1993.

Gagliardi *et al.*, "Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues", Cancer Chemother. Pharmacol., 41(2):117-124, 1998.

Galli, Comfurius, Maassen Hemker, de Baets, van Breda-Vriesman, Barbui, Zwaal, Bevers, "Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor", Lancet, 335(8705):1544-1547, 1990.

Galli, Barbui, Zwaal, Comfurius, Bevers, "Antiphospholipid antibodies: involvement of protein cofactors", Haematologica, 78(1):1-4, 1993.

Gavrieli, Sherman, Ben-Sasson, "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear ADN fragmentation", J. Cell Biol., 119(3):493-501, 1992.

Gefter *et al.*, "A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells", Somatic Cell Genet., 3:231-236, 1977.

Giovarelli *et al.*, "Tumor rejection and immune memory elicited by locally released LEC chemokine are associated with an impressive recruitment of APCs, lymphocytes, and granulocytes", J. Immunol., 164, 3200-3206, 2000.

Goding, In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2nd Edition, Academic Press, Orlando, Fl., pp. 6061,65-66,71-74, 1986.

Good *et al.*, "A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(17):6624-6628, 1990.

Graham, *et al.*, "Primary respiratory syncytial virus infection in mice", J. Med. Virol., 26(2):153-62, 1988.

Grant *et al.*, "Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration", Diabetes, 47(8): 1335-1340, 1998.

Hammill, Uhr, Scheuermann, "Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death", Exp. Cell Res., 251(1):16-21, 1999.

Haran *et al.*, "Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth", CancerRes., 54(21):5511-5514, 1994.

Harris, Zhang, Moghaddam, Fox, Scott, Pattison, Gatter, Stratford, Bicknell, "Breast cancer angiogenesis-- new approaches to therapy via antiangiogenesis, hypoxic activated drugs, and vascular targeting", Breast Cancer Res. Treat., 38(1):97-108, 1996.

Hasegawa, Suzuki, Ishii, Takakuwa, Tanaka, "Establishment of two distinct anticardiolipin antibody-producing cell lines from the same individual by Epstein-Barr virus transformation", Throm. Res., 74(1):77-84, 1994.

Hasselaar y Sage, "SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells", J. Cell Biochem., 49(3):272-283, 1992.

Hayashi, Nagashima, Terui, Kawamura, Matsumoto e Itazaki, "The Structure of PA48009; The Revised Structure of Duramycin", J. Antibiotics, XLIII(11):1421-1430, 1990.

Hellerqvist *et al.*, "Antitumor effects of GBS toxin: a polysaccharide exotoxin from group B beta-hemolytic streptococcus", J. CancerRes. Clin. Oncol., 120(1-2):63-70, 1993.

Hernnann and Devaux, "Alteration of the aminophospholipid translocase activity during *in vivo* and artificial aging of human erythrocytes", Biochim. Biophys. Acta., 1027(1):41-46, 1990.

Hinkovska-Galcheva, Petkova, Koumanov, "Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation", Cryobiology, 26(1):70-75, 1989.

Hiscox and Jiang, "Interleukin-12, an emerging antitumour cytokine", *In Vivo*, 11(2):125-132, 1997.

Holash *et al.*, "Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF", Science, 284:1994-1998, 1999.

Hori *et al.*, "Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants", Br. J. Pharmacol., 118(7):1584-1591, 1996.

Hotchkiss, Ashton, Mahmood, Russell, Sparano, Schwartz, "Inhibition of endothelial cell function *in vitro* and angiogenesis *in vivo* by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center", Mol. CancerTher, 1 (13):1191-200, 2002.

Huang, Molema, King, Watkins, Edgington, Thorpe, "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature", Science, 275:547-550, 1997.

Huse, Sastry, Iverson, Kang, Alting-Mees, Burton, Benkovic, Lerner, Science, 246(4935):1275-1281, 1989.

Igarashi, Umeda, Tokita, Soo Nam, Inoue, "Effective induction of antiphospholipid and anticoagulant antibodies in normal mouse", Thrombosis Res., 61:135-148, 1991.

Ingber *et al.*, "Angioinhibins: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth", Nature, 48:555-557, 1990.

Iwamoto *et al.*, "Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1O8O by a multimeric form of the laminin sequence TyrIle-Gly-Ser-Arg (YIGSR)", Br. J. Cancer, 73(5):589- 595, 1996.

Jackson et al, "Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein", Science, 266(5190):1581-1584, 1994.

Jendraschak and Sage, "Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology", Semin. CancerBiol, 7(3):139-146, 1996.

Jirholt, Ohlin, Borrebaeck, Soderlind, "Exploiting Sequence Space: Shuffling *In Vivo* Formed Complementarity Determining Regions Into a Master Framework", Gene, 215:471-476, 1998.

Jones, Dear, Foote, Neuberger, Winter, Nature, 321(6069): 522-525, 1986.

Julien, Tournier, Tocanne, "Differences in the transbilayer and lateral motions of fluorescent analogs of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the apical plasma membrane of bovine aortic endothelial cells", Exp. CellRes, 208(2):387-389, 1993.

Julien, Tournier, Tocanne, "Basic fibroblast growth factor modulates the aminophospholipid translocase activity present in the plasma membrane of bovine aortic endothelial cells", Eur. J. Biochem., 230:287-297, 1995.

Julien, Millot, Tocanne, Tounnier, "12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate inhibits aminophospholipid translo- case activity and modifies the lateral motions of fluorescent phospholipid analogs in the plasma membrane of bovine aortic endothelial cells", Experimental CellRes, 234:125-131, 1997.

Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, pp 647-669 in particular.

Kang, Barbas, Janda, Benkovic, Lerner, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A, 88(10):4363-4366, 1991.

Katsuragawa, Kanzaki, Inoue, Hirano, Mori, Rote, "Monoclonal antibody against phosphatidylserine inhibits *in vitro* human trophoblastic hormone production and invasion", Biology of Reproduction, 56:50-58, 1997.

Kellermann, Lottspeich, Henschen, Muller-Esterl, "Completion of the primary structure of human high-molecular-mass kininogen. The amino acid sequence of the entire heavy chain and evidence for its evolution by gene triplication", Eur. J. Biochem., 154(2):471-478, 1986.

Kendall and Thomas, "Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor", Proc. Natl., Acad. Sci. USA, 90:10705-10709, 1993.

Kenyon, Browne, D'Amato, "Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization", Exp. Eye Res., 64(6):971-978, 1997.

Keyt et al, "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis", J. Biol. Chem., 271(10):5638-46, 1996.

Kim, Li, Houck, Winer, Ferrara, "The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies", Growth Factors, 7:53-64, 1992.

Kim et al, "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*", Nature, 362:841-844, 1993.

Kim, Kwak, Ahn, So, Liu, Koh, Koh, "Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3", FEBS Lett, 443(3):353-6, 1999.

Kim *et al.*, "Immunohistological analysis of immune cell infiltration of a human colon tumor xenograft after treatment with Stealth liposome-encapsulated tumor necrosis factor-alpha and radiation", Int. J. Oncol., 21(5):973-9, 2002.

Kisch, and Johnson, "A plaque assay for respiratory syncytial virus", Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 112:583-9, 1963.

Kitamura, Kitagawa, Eukushima, Takagaki, Miyata, Nakanishi, "Structural organization of the human kini- nogen gene and a model for its evolution", J. Biol. Chem., 260(14):8610-8617, 1985.

Kleinman *et al.*, "The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases", Vitam. Horm., 47:161-186, 1993.

Kohler y Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", Nature, 256:495-497, 1975.

Kohler y Milstein, "Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion", Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976.

Kondo, Asano, Suzuki, "Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody", Biochem. Biophys. Res. Commun., 194:1234-1241, 1993.

Konieczny, Bobrzecka, Laidler, Rybarska, "The combination of 1gM subunits and proteolytic IgG fragment by controlled formation of interchain disulphides", Haematologia, 14(1):95-99, 1981.

Krajewska, Wang, Krajewski, *et al.*, "Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease", Cancer Res., 57(8):1605-1613, 1997.

Kuzu, Bicknell, Fletcher, Gatter, "Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors", Lab. Invest, 69(3):322-328, 1993.

Kyte and Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein", J. Mol. Biol., 157 (1):105-132, 1982.

Lane, Iruela-Arispe, Sage, "Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis *in vitro*. Changes in fibronectin, thrombospondin-1, and plasminogen activator inhibitor-1", J. Biol. Chem., 267(23):16736-16745, 1992.

Lee *et al.*, "Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression", Endocrinology, 139(9):3696-3703, 1998.

Leppink, Bishop, Sedmak, Henry, Ferguson, Streeter, Butcher, Orosz, "Inducible expression of an endothelial cell antigen on murine myocardial vasculature in association with interstitial cellular infiltration", Transplantation, 48 (5):874-877, 1989.

Levy, Gharavi, Sammaritano, Habina, Lockshin, "Fatty acid chain is a critical epitope for antiphospholipid antibody", J. Clin. Immunol, 10(3):141-145, 1990.

Lichtenbeld, Van Dam-Mieras, Hillen, "Tumour angiogenesis: pathophysiology and clinical significance", Neth. J. Med., 49(1):42-51, 1996.

Lin, Buxton, Acheson, Radziejewski, Maisonpierre, Yancopoulos, Channon, Hale, Dewhirst, George, Peters,

"Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2", Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95(15):8829-34, 1998.

Lin, Sankar, Shan, Dewhirst, Polverini, Quinn, Peters, "Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor", Cell Growth Differ., 9:49-58, 1998b.

Linder and Borden, "Effects of tamoxifen and interferon-beta or the combination on tumor-induced angiogene- sis", Int. J. Cancer, 71(3):456-461, 1997.

Lingen, Polverini, Bouck, "Inhibition of squamous cell carcinoma angiogenesis by direct interaction of retinoic acid with endothelial cells", Lab. Invest., 74(2):476-483, 1996.

Lingen, Polverini, Bouck, "Retinoic acid and interferon alpha act synergistically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma", Cancer Res., 58(23):5551-5558, 1998.

Liu, Moy, Kim, Xia, Rajasekaran, Navarro, Knudsen, Bander, "Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium", Cancer Res., 57:36293634, 1997.

Lucas, Garcia, Donati, Hribar, Mandriota, Giroud, Buurman, Fransen, Suter, Nunez, Pepper, Grau, "Both TNF receptors are required for direct TNF-mediated cytotoxicity in microvascular endothelial cells", Eur. J. Immunol., 28(11):3577-3586, 1998.

Luo, Toyoda, Shibuya, "Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse asci- tes tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody", Cancer Res., 58 (12):2594-2600, 1998a.

Luo *et al.*, "Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors", CancerRes., 58(12):2652-2660, 1998b.

Lupu, Moldovan, Ryan, Stern, Simionescu, "Intrinsic procoagulant surface induced by hypercholestrolaemia on rabbit aortic endothelium", Blood Coagul. Fibrinolysis, 4(5):743-752, 1993.

Majewski et al, "Vitamin D3 is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis", J. Investig. Dermatol. Symp. Proc., 1(1):97-101, 1996.

Maneta-Peyret, Bessoule, Geffard, Cassagne, "Demonstration of high specificity antibodies against phosphatidylserine", J. Immun. Meth., 108:123-127, 1988.

Maneta-Peyret, Freyburger, Bessoule, Cassagne, "Specific immunocytochemical visualization of phosphatidylserine", J. Immun. Methods, 122:155-159, 1989.

Manetti *et al.*, "Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor", Bioorg. Med. Chem., 6(7):947-958, 1998.

Massey *et al.*, Nature, 328:457-458, 1987.

McEvoy, Williamson, Schlegel, "Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythocyte recognition by macrophages", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83(10):3311-3315, 1986.

McNeil, Simpson, Chesterman, Krilis, "Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H)", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(11):4120-4124, 1990.

Menon, Rahman, Ravirajan, Kandiah, Longhurst, McNally, Williams, Latchman, Isenberg, "The production, binding characteristics and sequence analysis of four human IgG monoclonal antiphospholipid antibodies", J. Autoimmunity, 10:43-57, 1997.

Mesiano, Ferrara. Jaffe, "Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization", Am. J. Pathol., 153(4):1249-1256, 1998.

Millauer, Longhi, Plate, Shawver, Risau, Ullrich, Strawn, "Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*", Cancer Res., 56:1615-1620, 1996.

Mills, Brooker, Camerini-Otero, "Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription", Nucl Acids Res., 18:7305-7316, 1990.

Moore *et al.*, "Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines", J. Lab. Clin. Med., 132(2):97-103, 1998.

Morrison, Johnson, Herzenberg, Oi, "Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81(21):6851-6855, 1984.

Morrison, Wims, Kobrin, 01, "Production of novel immunoglobulin molecules by gene transfection", Mt. Sinai J. Med, 53(3): 175, 1986.

Muller, *et al.*, "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 A resolution and mutational analysis of the interface", Structure, 6(9):1153-67, 1998.

Muyldermans, Cambillau y Wyne, "Recognition of Antigens by Single-Domain Antibody Fragments: The Superfluous Luxury of Paired Domains", TRENDS, 26(4):230-235, 2001.

Munro, "Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases", European. Heart Journal, 14:7277, 1993.

Nagler, Feferman, Shoshan, "Reduction in basic fibroblast growth factor mediated angiogenesis *in vivo* by linomide", Connect TissueRes, 37(1-2):61-68, 1998.

Nakamura et al, Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems, Chapter 27.

Nakamura and Racker, "Inhibitory Effect of Duramycin or Partial Reactions Catalyzed by (Na+, K+)-Adenosinetriphosphatase from Dog Kidney", Biochemistry, 23(2):385-389, 1984.

Nilsson, Kosmehl, Zardi, Neri, "Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice", Cancer Res., 61(2):711-716, 2001.

Nuttall, Irving and Hudson, "Immunoglobulin V_h Domains and beyond: Design and Selection of Single-Domain Binding and Targeting Reagents", Current Pharma. Biotech., 1(3):253-262, 2000.

Ohizumi, Tsunoda, Taniguchi, Saito, Esaki, Makimoto, Wakai, Tsutsumi, Nakagawa, Utoguchi, Kaiho, Ohsugi, Mayumi, "Antibody-based therapy targeting tumor vascular endothelial cells suppresses solid tumor growth in rats", Biochem. Biophys. Res. Comm., 236:493-496, 1997.

Oikawa *et al.*, "A highly potent antiangiogenic activity of retinoids", Cancer Lett., 48(2):157-162, 1989.

O'Reilly *et al.*, "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma", Cell, 79:315-328, 1994.

O'Reilly *et al.*, "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth", Cell, 88(2):277.285, 1997.

Orr, Wang, Lafrenie, Scherbarth, Nance, "Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis", J. Pathology, 190:310-329, 2000.

Parmley and Smith, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes", Gene, 73(2):305-318, 1988.

Patey, Vazeux, Canioni, Potter, Gallatin, Brousse, "Intercellular adhesion molecule-3 on endothelial cells: Expression in tumors but not in inflammatory responses", Am. J. Pathol., 148:465-472, 1996.

Pepper *et al.*, "Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibits angiogenesis *in vitro*", J. Cell Sci., 108(Pt 1):73-83, 1995.

Presta, Chen, O'Connor, Chisholm, Meng, Krummen, Winkler, Ferrara, "Humanization of an antivascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders", Cancer Res., 57:4593-4599, 1997.

Price, "Metastasis from human breast cancer cell lines", Breast Cancer Research Treatment, 39:93-102, 1996.

Qamar, Gharavi, Levy, Lockshin, "Lysophosphatidylethanolamine is the antigen to which apparent antibody to phosphatidylethanolamine binds", J. Clin. Immunol., 10(4):200-203, 1990.

Qu, Conroy, Walker, Wooding, Lucy, "Phosphatidylserine-mediated adhesion of T-cells to endothelial cells", J. Biochem., 317(Pt 2):343-346, 1996.

Quinn *et al.*, "CM1O1, a polysaccharide antitumor agent, does not inhibit wound healing in murine models", J. CancerRes. Clin. Oncol, 121(4):253-256, 1995.

Ran, Gao, Duffy, Watkins, Rote, Thorpe, "Infarction of solid Hodgkin's tumors in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature", Cancer Res., 58(20):4646-4653, 1998.

Ran, Downes, Thorpe, "Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of activated endothelial cells and tumor blood vessels", Proceedings of AACR, No. 2615 (Abstract):527, 2002.

Rao, Tait, Hoang, "Binding of annexin V to a human ovarian carcinoma cell line (OC-2008). Contrasting effects on cell surface factor Vila/tissue factor activity and prothrombinase activity", Thromb. Res., 67(5):517-531, 1992.

Rauch, Tannenbaum, Tannenbaum, Ramelson, Cullis, Tilcock, Hope, Janoff, "Human hybridoma lupus anticoagulants distinguish between lamellar and hexagonal phase lipid systems", J. Biol. Chem., 261(21):9672-9677, 1986.

Rauch and Janoff, "Phospholipid in the hexagonal II phase is immunogenic: evidence for immunorecognition of nonbilayer lipid phases *in vivo*", Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87(11):4112-4114, 1990.

Ravirajan, Harmer, McNally, Hohmann, Mackworth-Young, Isenberg, "Phospholipid binding specificities and idiotype expression of hybridoma derived monoclonal autoantibodies from splenic cells of patients with systemic lupus erythematosus", Ann. Rheumatic Diseases, 54:471-476, 1995.

RayChaudhury y D'Amore, "Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta", J. Cell Biochem., 47(3):224-229, 1991.

Richer y Lo, "Introduction of human ADN into mouse eggs by injection of dissected human chromosome fragments", Science 245, 175-177, 1989.

Riechmann, Clark, Waldmann, Winter, "Reshaping human antibodies for therapy", Nature, 332(6162):323-327, 1988.

Riechmann y Muyldermans, "Single Domain Antibodies: Comparison of Camel VH and Camelised Human VH Domains", J. ImmunolMethods., 231:25-38, 1999.

Rimassa *et al.*, "Unexpected low efficacy of stealth liposomal doxorubicin (Caelyx) and vinorelbine in the treatment of metastatic breast cancer", Breast Cancer Research and Treatment, 77(2):185-8, 2003.

Rosenthal *et al.*, "A phase I study of SPI-077 (Stealth liposomal cisplatin) concurrent with radiation therapy for locally advanced head and neck cancer", Investigational New Drugs, 20(3)343-9:, 2002.

Rote, Ng, Dostal-Johnson, Nicholson, Siekman, "Immunologic detection of phosphatidylserine externalization during thrombin-induced platelet activation", Clin. Immunol. Immunopathol., 66: 193-200, 1993.

Rote, Chang, Katsuragawa, Ng, Lyden, Mori, "Expression of phosphatidylserine-dependent antigens on the surface of differentiating BeWo human choriocarcinoma cells", Am. J. Reprod Immun, 33:114-121, 1995.

Rote, "Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss", Am. J. Reprod. Immun., 35:394-401, 1996.

Ruf, Rehemtulla, Edgington, "Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function", Biol. Chem., 266:2158-2166, 1991.

Ruf and Edgington, "Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis *in vivo*", FASEB J., 8:385390, 1994.

Sakamoto *et al.*, "Heparin plus cortisone acetate inhibit tumor growth by blocking endothelial cell proliferation", Canc. J., 1:55-58, 1986.

Saleh, Stacker, Wilks, "Inhibition of growth of C6 glioma cells *in vivo* by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence", Cancer Res., 56:393-401, 1996.

Sambrook, Fritsch, Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Sang, "Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis", CellRes, 8(3):171-177, 1998.

Sanlioglu, Williams, Samavati, Butler, Wang, McCray, Ritchie, Hunninghake, Zandi, and Engelhardt, J.

Biol. Chem., 32: 30188, 2001.

Schlaepfer, Mehlman, Burgess, Haigler, "Structural and functional characterization of endonexin II, a calcium- and phospholipid-binding protein", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84(17):6078-6082, 1987.

Schorer, Rick, Swaim, Moldow, "Structural features of endotoxin required for stimulation of endothelial cell tissue factor production; exposure of preformed tissue factor after oxidant-mediated endothelial cell injury", J. Lab. Clin. Med., 106:38-42, 1985.

Seigneuret y Devaux, "ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81(12): 3751-3755, 1984.

Sessions y Horwitz, "Myoblast aminophospholipid asymmetry differs from that of fibroblasts", FEBS Lett., 134 (1):75-78, 1981.

Shaughnessy, Buchanan, Turple, Richardson, Orr, "Walker carcinosarcoma cells damage endothelial cells by the generation of reactive oxygen speciesm" A. J. Path., 134(4):787-796, 1989.

Sheibani y Frazier, "Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(15):6788-6792, 1995.

Sheu *et al.*, "Inhibition of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and antialpha(v)beta3 integrin monoclona] antibody", Biochim. Biophys. Acta, 1336 (3):445-454, 1997.

Shotwell, Stodola, Michael, Lindenfelser, Dworschack and Pridham, "Antibiotics Against Plant Disease. III. Duramycin, a New Antibiotic from Streptomyces Cinnamomeus Forma Azacoluta", N. Utiliza. Res. Dev. Div., 80: 3912-3915, 1958.

Sideras, Mizuta, Kanamori, Suzuki, Okamoto, Kuze, Ohno, Doi, Fukuhara, Hassan, *et al.*, "Production of sterile transcripts of C gamma genes in an 1gM-producing human neoplastic B cell line that switches to IgG-producing cells", Intl. Immunol., 1(6):631-642, 1989.

Siemeister, Martiny-Baron, Marme, "The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities", Cancer Metastasis Rev., 17(2):241-248., 1998.

Singh *et al.*, "Stealth monensin liposomes as a potentiator of adriamycin in cancer treatment", Journal of Controlled Release, 59(1):43-53, 1999.

Sioussat, Dvorak, Brock, Senger, "Inhibition of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) with antipeptide antibodies", Arch. Biochem. Biophys., 301:15-20, 1993.

Sipos *et al.*, "Inhibition of tumor angiogenesis", Ann. NY Acad. Scid., 732:263-272, 1994.

Sluiter, Pietersma, Lamers, Koster, "Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium: their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanisms underlying their expression", J. Cardiol. Pharmacol., 22:S37-S44, 1993.
Smirnov, Triplett, Comp, Esmon, Esmon, "On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies", J. Clin. Invest., 95(1):309-316, 1995.

Soares, Shaughnessy, MacLarkey, Orr, "Quantification and morphologic demonstration of reactive oxygen species produced by Walker 256 tumor cells *in vitro* and during metastasis *in vivo*", Laboratory Invest., 71(4):480-489, 1994.

Soderlind, Ohlin and Carlsson, "Complementarity-Determing Region (CDR) Implantation: A Theme of Recombination", Immunotech., 4:279-285, 1999.

Soderlind, Strandberg, Jirholt, Kobayashi, Alexeiva, Aberg, Nilsson, Jansson, Ohlin, Wingren, Danielsson, Carisson and Borrebaeck, "Recombining Germline-Derived CDR Sequences for Creating Diverse Single-Framework Antibody Libraries", Nature Biotech., 18:852-856, 2000.

Soff *et al.*, "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model", J. Clin. Invest., 96(6): 2593-2600, 1995.

Staal-van den Brekel, Thunnissen, Buurman, Wouters, "Expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 in non-small-cell lung carcinoma", Virchows Arch., 428:21-27, 1996.

Staub, Harris, Khamashta, Savidge, Chahade, Hughes, "Antibody to phosphatidylethanolamine in a patient with lupus anticoagulant and thrombosis", Ann. Rheum. Dis., 48(2):166-169, 1989.

Stella *et al.*, "Prodrugs: A chemical approach to targeted drug delivery ", Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, Eds. Human Press, 1985, pp 247-267.

Stone, Rut Miles, Edgington, Wright, "Recombinant soluble human tissue factor secreted by Saccharomyces cerevisiae and refolded from E. coli inclusion bodies: glycosylation of mutants, activity, and physical characterization", Biochem. J., 310(2): 605-614, 1995.

Sugi and McIntyre, "Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex", Blood, 86(8):3083-3089, 1995.

Sugi and McIntyre, "Phosphatidylethanolamine induces specific conformational changes in the kininogens recognizable by antiphosphatidylethanolamine antibodies", Thromb. Haemost, 76(3):354-360, 1996a.

Sugi and McIntyre, "Autoantibodies to kininogen- phosphatidylethanolamine complexes augment thrombin-induced platelet aggregation", Thromb. Res., 84(2):97-109, 1996b.

Sugimura, Donato, Kakar, Scully, "Annexin V as a probe of the contribution of anionic phospholipids to the procoagulant activity of tumor cell surfaces", Blood Coagul. Fibrinolysis, 5(3):365-373, 1994.

Symon *et al.*, "Selective delivery of doxorubicin to patients with breast carcinoma metastases by stealth liposomes", Cancer, 86(1):72-8, 1999.

Tada *et al.*, "Inhibition of tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells by co-culture with chondrocytes and involvement of transforming growth factor beta: a model for avascularity in human cartilage", Biochim. Biophys. Acta, 1201(2)135-142, 1994.

Tait and Smith, "Phosphatidylserine receptors: role of CD36 in binding of anionic phospholipid vesicles to monocytic cells", J. Biol. Chem., 274(5):3048-3054, 1999.

Takano *et al.*, "Suramin, an anticancer and angiosuppressive agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast growth factor, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator", Cancer Res., 54 (10):2654-2660, 1994.

Tanaka et al, "Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 c ADN inhibits angiogenesis and tumor growth", Nat. Med., 3(4):437-442, 1997.

Test y Mitsuyoshi, "Activation of the alternative pathway of complement by calcium-loaded erythrocytes resulting from loss of membrane phospholipid asymmetry", J. Lab. Clin. Med., 130(2): 169-182, 1997.

Thornhill, Kyan-Aung, Haskard, "IL-4 increases human endothelial cell adhesiveness for T cells but not for neutrophils", J. Immunol., 144:3060-3065, 1990.

Thorpe et al, "Heparin-Steroid Conjugates: New Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice", CancerRes, 53: 3000-3007, 1993.

Thorpe and Ran, "Tumor infarction by targeting tissue factor to tumor vasculature", Cancer J. Sci. Am., 6(Suppl 3): S237-S244, 2000.

Tolsma *et al.*, "Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have antiangiogenic activity", J. Cell Biol., 122(2):497-511, 1993.

Tryggvason, "The laminin family", Curr. Opin. Cell Biol., 5(5):877-882, 1993.

Tsavaris, Kosmas, Vadiaka, Kanelopoulos, Boulamatsis, "Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes", Brit. J. Cancer, 87(1):21-7, 2002.

Umeda, Igarashi, Nam, Inoue, "Effective production of monoclonal antibodies against phosphatidylserine: Stereo-specific recognition of phosphatidylserine by monoclonal antibody", J. Immun., 143(7):2273-2279, 1989.

Umeda and Emoto, "Membrane Phospholipid Dynamics During Cytokinesis: Regulation of Actin Filament Assembly by Redistribution of Membrane Surface Phospholipid", Chem. Phys. Lipids, 101:81-91, 1999.

Utsugi, Schroit, Connor, Bucana, Fidler, "Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes", Cancer Res., 51(11):3062-3066, 1991.

Valenzuela, Griffiths, Rojas, Aldrich, Jones, Zhou, Mc-Clain, Copeland, Gilbert, Jenkins, Huang, Papa- dopoulos, Maison-pierre, Davis, Yancopoulos, "Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans", Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96(5):1904-9, 1999.

van Dijk, Warnaar, van Eendenburg, Thienpont, Braakman, Boot, Fleuren, Bolhuis, "Induction of tumor-cell lysis by bispecific monoclonal antibodies recognizing renal-cell carcinoma and CD3 antigen", Int. J. Cancer, 43:344349, 1989.

Vitetta *et al.*, "Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma", Cancer Res., 15:4052-4058, 1991.

Vlachoyiannopoulos, Beigbeder, Duelanes, Youinou, Hunt, Krilis, Moutsopoulos, "Antibodies to phosphatidylethanolamine in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: their correlation with anticardiolipin antibodies and beta 2 glycoprotein-I plasma levels", Autoimmunity, 16(4):245-249, 1993.

Vogt, Ng, Rote, "A model for the antiphospholipid antibody syndrome: Monoclonal antiphosphatidylserine antibody induces intrauterine growth restriction in mice", Am. J. Obstet. Gynecol., 174:700-707, 1996.

Vogt, Ng, Rote, "Antiphosphatidylserine antibody removes Annexin V and facilitates the binding prothrombin at the surface of a choriocarcinoma model of trophoblast differentiation", Am. J. Obstet. Gynecol., 177:964-972, 1997.

Volpert, Lawler, Bouck, "A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases viathrombospondin-1", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(11):6343-6348, 1998.
Vukanovic *et al.*, "Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide", Cancer Res., 53(8):1833- 1837, 1993.

Wakamatsu, Choung, Kobayashi, Inoue, Higashijima y Miyazawa, "Complex Formation of Peptide Antibiotic Ro09-0198 with Lysophosphatidylethanolamine ^{1}H NMR Analysis in Dimethyl Sulfoxide Solution", Biochemistry, 29(1):113-118, 1986.

Waltenberger *et al.*, "Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action", J. Mol. Cell Cardiol., 28(7):1523-1529, 1996.

Wamil *et al.*, "Soluble E-selectin in cancer patients as a marker of the therapeutic efficacy of. CM1O1, a tumor-inhibiting antineovascularization agent, evaluated in phase I clinical trail", J. Cancer Res. Clin. Oncol., 123(3):173-179, 1997.

Wang and Joseph, "Mechanisms of hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells", Free Rad. Biol. Med., 28(8):1222-1231, 2000.

Wells, "Starving cancer into submission", Chem. Biol., 5(4):R87-88, 1998.

Wiesmann, *et al.*, "Crystal structure at 1.7 A resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor", Cell, 91(5):695-704, 1997.
Weiss, Young, LoBuglio, Slivka y Nimeh, "Role of Hydrogen Peroxide in Neutrophil-Mediated Destruction of Cultured Endothelial Cells", J. Clin. Invest., 68:714-721, 1981.

Williamson and Schlegel, "Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells", Molec. Mem. Biol., 11:199-216, 1994.

Willman *et al.*, "Prodrugs in cancer therapy", Biochem. Soc. Trans., 14:375-382, 1988.

Winter y Milstein, "Man-made antibodies", Nature, 349: 293-299, 1991.

Wolff *et al.*, "Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures *in vitro* and angiogenesis *in vivo*", Klin. Padiatr., 209(4):275-277, 1997.

Yamada, Moldow, Sacks, Craddock, Boogaens y Jacob, "Deleterious Effects of Endotoxin on Cultured En- dothelial Cells: An *in vitro* Model of Vascular injury", Inflammation, 5:115-116, 1981.

Yamamura *et al.*, "Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis", Semin. Cancer Biol., 4(4):259-265, 1993.

Yoon *et al.*, "Inhibitory effect of Korean mistletoe (Viscum album coloratum) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice", Cancer Lett., 97(1):83-91, 1995.

Yoshida *et al.*, "Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP47O: possible involvement of nitric oxide synthase", Cancer Res., 58(16):3751-3756, 1998.

Zapata *et al.*, Protein Eng., 8(10):1057-1062, 1995.

Zhao, Zhou, Wiedmer, Sims, "Level of expression of phospholipid scramblase regulates induced movement of phosphatidylserine to the cell surface", J. Biol. Chem., 273:6603-6606, 1998.

Zhou, Zhao, Stout, Luhm, Wiedmer, Sims, "Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids", J. Biol. Chem., 272 (29):18240-18244, 1997.

Ziche *et al.*, "Linomide blocks angiogenesis by breast carcinoma vascular endothelial growth factor transfectants", Br. J. Cancer, 77(7):1123-1129, 1998.

Zulueta, Yu, Hertig, Thannickal, Hassoun, "Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygena- tion: role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane", Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 12(1):41-49, 1995.

Zwaal, Bevers, Comfurius, Rosing, Tilly, Verhallen, "Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and sickled red cells; mechanisms and physiological significance", Mol. Cell. Biochem., 91:23-31, 1989.

Zwaal y Schroit, "Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells", Blood, 89(4):1121-1132, 1997.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un anticuerpo purificado, o fragmento de unión a antígeno o inmunoconjugado del mismo, en el que dicho anticuerpo:

(a) comprende una región variable de cadena pesada que incluye los restos de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las posiciones de aminoácidos 31-35 (CDR H1), 50-56 (CDR H2) y 95-102 (CDR H3) de la SEC ID Nº: 2, y una región variable de cadena ligera que incluye los restos de aminoácidos de las CDR de las posiciones de aminoácidos 24-34 (CDR L1), 50-56 (CDR L2) y 89-97 (CDR L3) de la SEC ID Nº: 4;
(b) se une a fosfatidilserina en un ELISA realizado en presencia de suero al 10 % y comprende una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2; o una región variable de cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4; o
(c) se une a fosfatidilserina en un ELISA realizado en presencia de suero al 10 % y comprende una región variable de cadena pesada que incluye una variante o forma mutagenizada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2; en la que dicha variante o forma mutagenizada tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 96 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2; y una región variable de cadena ligera que incluye una variante o forma mutagenizada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4, en la que dicha variante o forma mutagenizada tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 96 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4;

y en la que dicho ELISA tiene el protocolo:

la placa de 96 pocillos se recubre con fosfatidilserina (FS) de la siguiente manera:

- diluir la solución madre de FS en n-hexano a 10 μg/μl y mezclar bien
- añadir 50 μl a cada pocillo y permitir que éste se evapore durante una hora

añadir a cada pocillo 200 μl de tampón de bloqueo, donde dicho tampón de bloqueo es suero bovino al 10 % disuelto en PBS, cubrir y conservar a temperatura ambiente durante 2 horas o durante una noche a 4 ºC
lavar la placa tres veces con PBS
añadir anticuerpo primario a la muestra de ensayo diluido en dicho tampón de bloqueo e incubar durante 2 horas a 27 ºC
lavar la placa tres veces con PBS
añadir 100 μl/pocillo de anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón, de cabra, conjugado con HRP u otro anticuerpo secundario apropiado) e incubar durante 1 hora a 37 ºC
lavar la placa tres veces con PBS
revelar el ELISA añadiendo 100 μl de solución reveladora a cada uno de los pocillos, revelar durante 10 minutos, después añadir a cada pocillo 100 μl de solución determinación y leer la densidad óptica 490 nm
siendo la solución reveladora Na_2PO_4 0,2 M, 10 ml de ácido cítrico 0,1 M y un comprimido de 10 mg de o-fenilendiamina y 10 μl de peróxido de hidrógeno
siendo la solución de terminación H_2SO_4 0,18 M.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo se une a fosfatidilserina en dicho ELISA y comprende una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2 o una región variable de cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4.

3. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo se une a fosfatidilserina en dicho ELISA y comprende una región variable de cadena pesada que incluye una variante o forma mutagenizada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2; en la que dicha variante o forma mutagenizada tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 96 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2; y una región variable de cadena ligera que incluye una variante o forma mutagenizada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4, en la que dicha variante o forma mutagenizada tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 96 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4.

4. La composición de la reivindicación 2 o 3, en la que dicho anticuerpo compite eficazmente con el anticuerpo monoclonal 3G4 (depositado como ATCC PTA 4545) por la unión con fosfatildilserina en dicho ELISA.

5. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho anticuerpo se une a fosfatidilserina en dicho ELISA y comprende una región variable de cadena pesada que incluye una variante o forma mutagenizada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2; en la que dicha variante o forma mutagenizada tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 97 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2; y una región variable de cadena ligera que incluye una variante o forma mutagenizada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4, en la que dicha variante o forma mutagenizada tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 97 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4.

6. La composición de la reivindicación 5, en la que dicho anticuerpo se une a fosfatidilserina en dicho ELISA y comprende una región variable de cadena pesada que incluye una variante o forma mutagenizada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2; en la que dicha variante o forma mutagenizada tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 98 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2; y una región variable de cadena ligera que incluye una variante o forma mutagenizada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4, en la que dicha variante o forma mutagenizada tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 98 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4.

7. La composición de la reivindicación 6, en la que dicho anticuerpo se une a fosfatidilserina en dicho ELISA y comprende una región variable de cadena pesada que incluye una variante o forma mutagenizada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2; en la que dicha variante o forma mutagenizada tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 99 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2; y una región variable de cadena ligera que incluye una variante o forma mutagenizada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4, en la que dicha variante o forma mutagenizada tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 99 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4.

8. La composición de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que incluye los restos de aminoácidos de las CDR de las posiciones de aminoácidos 31-35 (CDR H1), 50-56 (CDR H2) y 95-102 (CDR H3) de la SEC ID Nº: 2, y una región variable de cadena ligera que incluye los restos de aminoácidos de las CDR de las posiciones de aminoácidos 24-34 (CDR L1), 50-56 (CDR L2) y 89-97 (CDR L3) de la SEC ID Nº: 4.

9. La composición de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2 y una región variable de cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4.

10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado, dimérico, trimérico, multimérico, en parte humano, quimérico, biespecífico, recombinante o modificado por ingeniería genética; o un scFv, Fv, Fab', Fab, dímero Fab, diacuerpo, anticuerpo lineal, $F(ab')_2$, CDR, fragmento univalente, camelizado o de dominio sencillo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

11. Una composición que comprende un anticuerpo quimérico, en el que al menos una primera región de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal de ratón 3G4, depositado como ATCC PTA 4545, está unido operativamente a una región constante de anticuerpo humano.

12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho anticuerpo está unido operativamente a un agente biológico, un agente de diagnóstico o un agente terapéutico adicional.

13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicho composición es una composición farmacéuticamente aceptable, en la que opcionalmente y preferentemente la composición farmacéuticametne aceptable comprende adicionalmente un agente terapéutico adicional.

14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicho composición es una composición en aerosol.

15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicho composición es una composición de liposomas o de nanopartículas farmacéuticamente aceptable; y en el que opcionalmente y preferentemente en la que dicha composición farmacéuticamente aceptable es una composición de liposomas, siendo el liposoma un liposoma furtivo o PEGilado que se recubre con dicho anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y en el que opcionalmente y adicionalmente dicho preferentemente liposoma furtivo o PEGilado comprende uno o más agentes terapéuticos adicionales.

16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en la que dicho agente terapéutico adicional es:

(a) un agente anti-angiogénico o un agente anticanceroso;
(b) una citotoxina, un agente quimioterapéutico, un agente radioterapéutico, un inhibidor de tirosina quinasa, un agente inductor de apoptosis, un esteroide, un antimetabolito, un análogo de ácido fólico, un fármaco anti-tubulina, un inhibidor de topoisomerasa, un taxano, una combretastatina, un antibiótico, un complejo de coordinación de platino, una citocina, un agente alquilante o coagulante;
(c) docetaxel, paclitaxel, 5-fluorouracilo, gemcitabina, irinotecan, cisplatino o carboplatino.

17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en diagnóstico o en terapia.

18. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento de una enfermedad angiogénica inhibiendo la angiogénesis, preferentemente para su uso en el tratamiento de degeneración macular, artritis, aterosclerosis, retinopatía diabética, hiperplasia tiroidea, enfermedad de Grave, hemangioma, glaucoma neovascular o psoriasis.

19. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento del cáncer.

20. La composición de la reivindicación 19, para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con quimioterapia o radioterapia.

21. La composición de la reivindicación 20, para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con el agente quimioterapéutico docetaxel, paclitaxel, 5-fluorouracilo, gemcitabina, irinotecan, cisplatino o carboplatino.

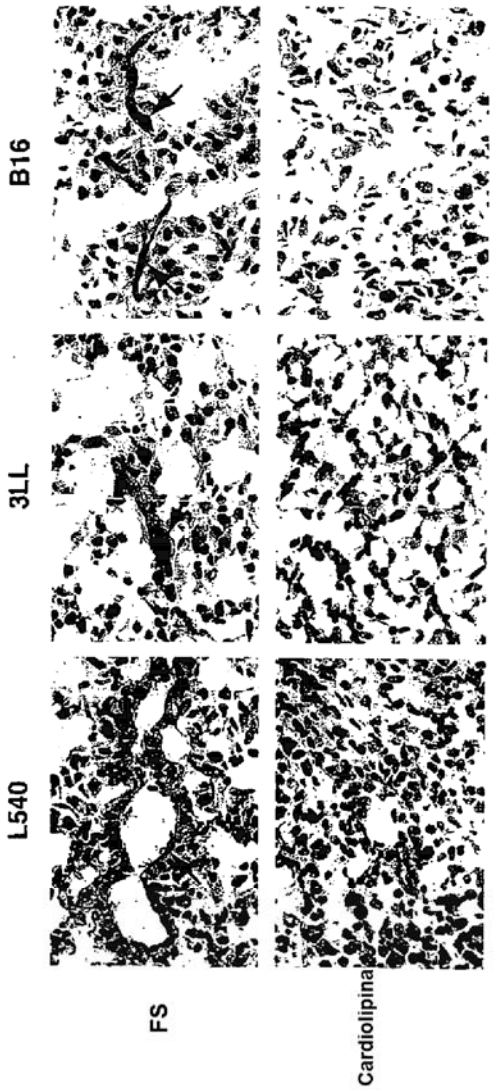


FIG. 1

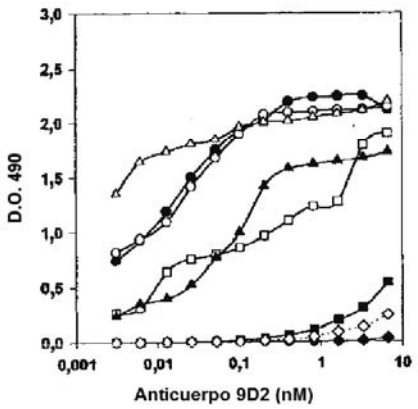

D.O. 490
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
Anticuerpo 9D2 (nM)

FIG. 2A

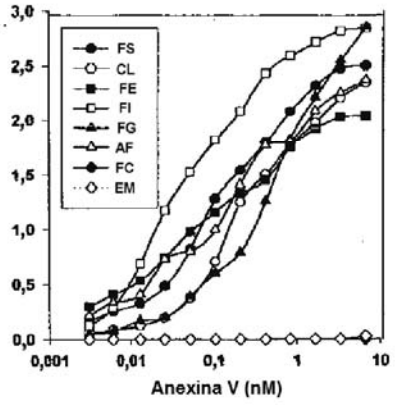

FS
CL
FE
FI
FG
AF
FC
EM
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
Anexina V (nM)

FIG. 2B

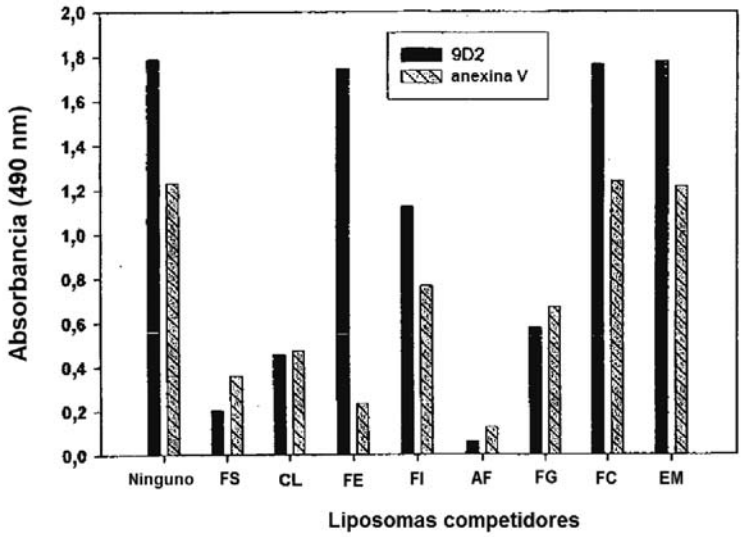

2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Absorbancia (490 nm)
9D2
anexina V
Ninguno
FS
CL
FE
FI
AF
FG
FC
EM
Liposomas competidores

FIG. 3

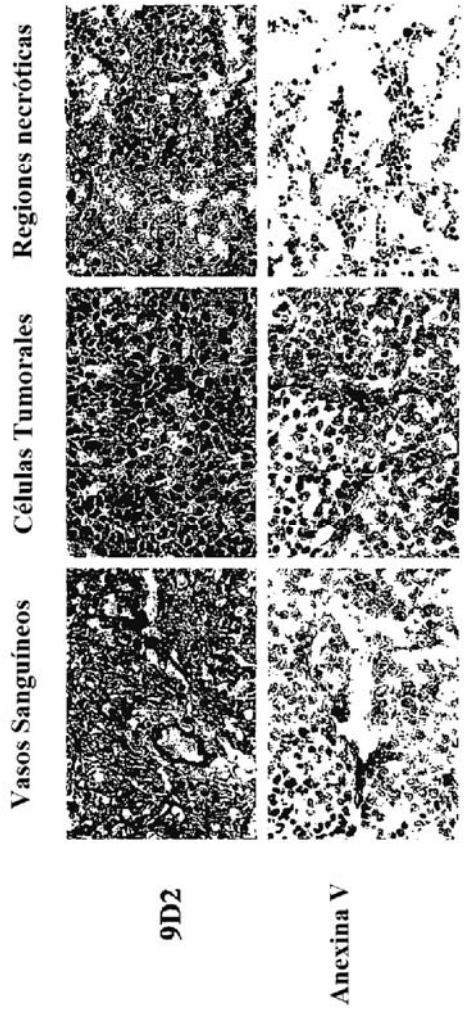

Vasos Sanguíneos
Células Tumorales
Regiones necróticas
9D2
Anexina V

FIG. 4

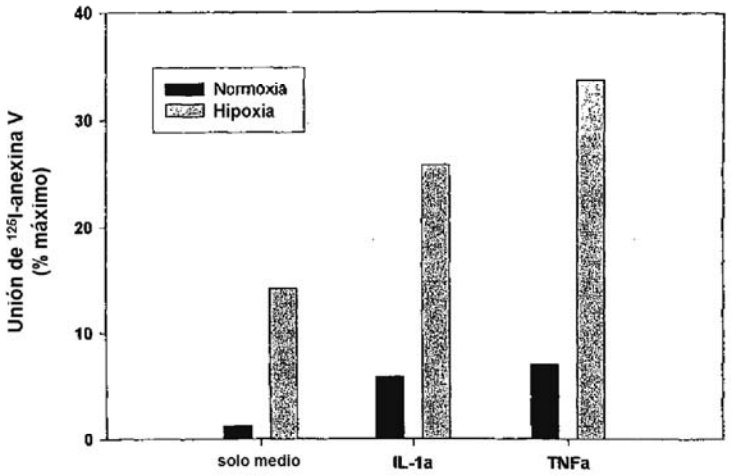

Unión de 125I-anexina V
(% máximo)
40
30
20
10
0
Normoxia
Hipoxia
solo medio
IL-1a
TNFa

FIG. 5

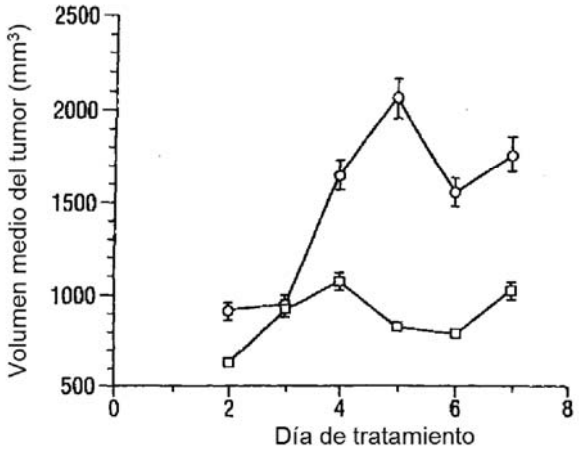

2500
2000
1500
1000
500
Volumen medio del tumor (mm³)
0
2
4
6
8
Día de tratamiento

FIG. 6A

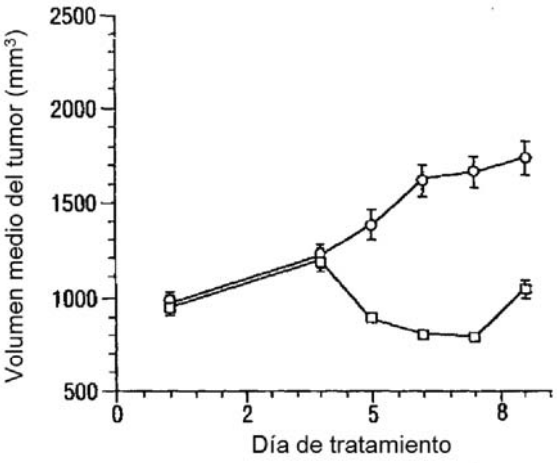

2500
2000
1500
1000
500
Volumen medio del tumor (mm³)
0
2
5
8
Día de tratamiento

FIG. 6B

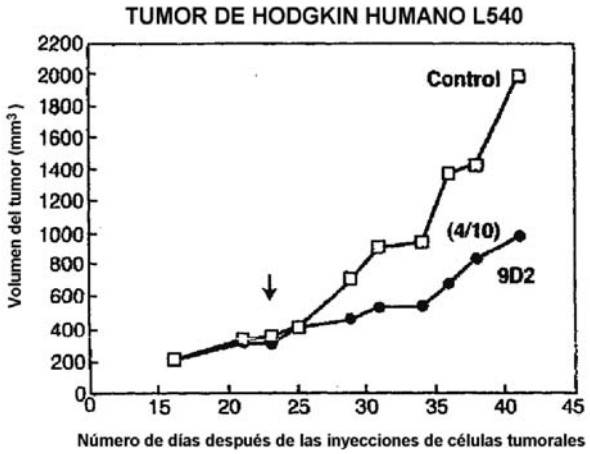

TUMOR DE HODGKIN HUMANO L540
Volumen del tumor (mm3)
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
15
20
25
30
35
40
45
Control
(4/10)
9D2
Número de días después de las inyecciones de células tumorales

FIG. 7

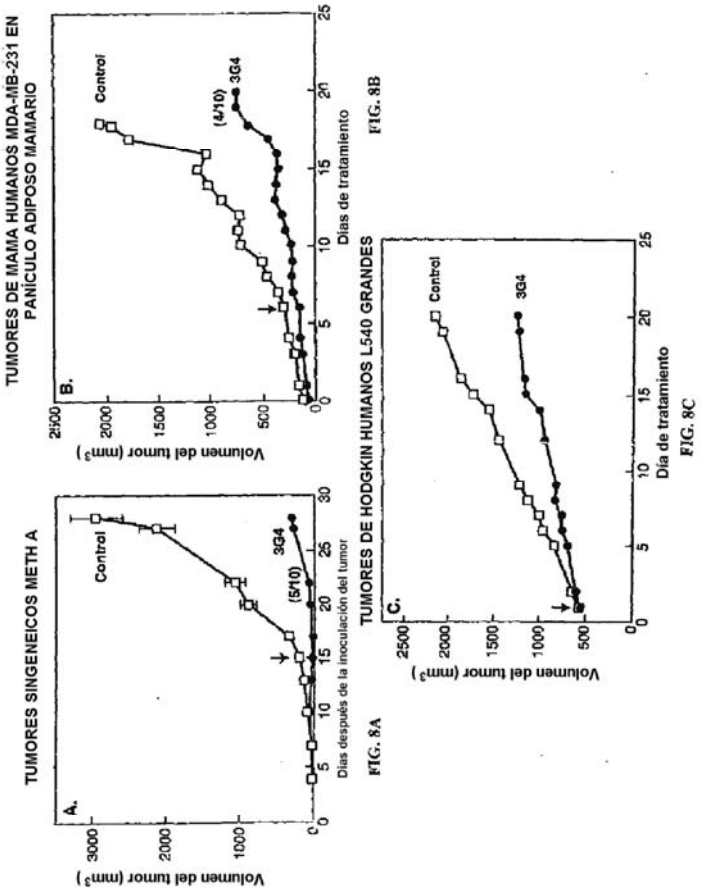


FIG. 8A FIG. 8B FIG. 8C

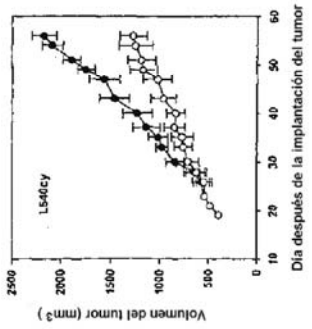


FIG. 8D

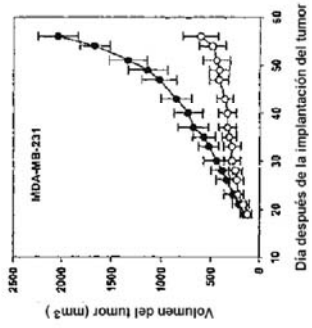


FIG. 8E

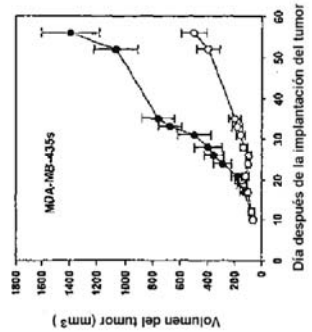


FIG. 8F

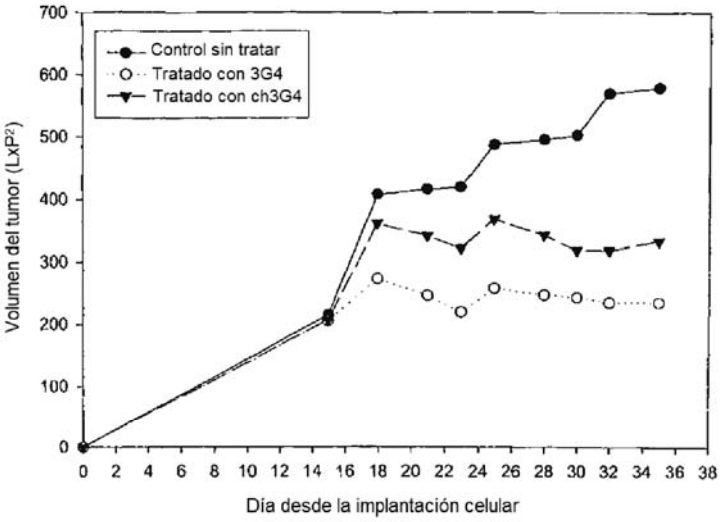

Control sin tratar
Tratado con 3G4
Tratado con ch3G4
Volumen del tumor (LxP²)
Día desde la implantación celular
0
100
200
300
400
500
600
700
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38

FIG. 8G

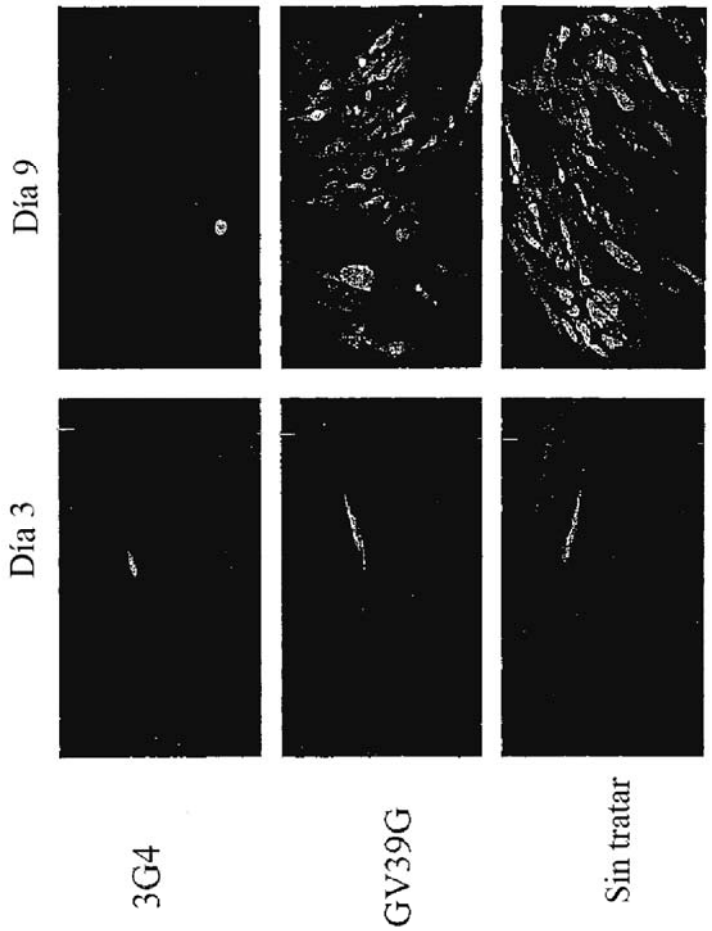


FIG. 9A

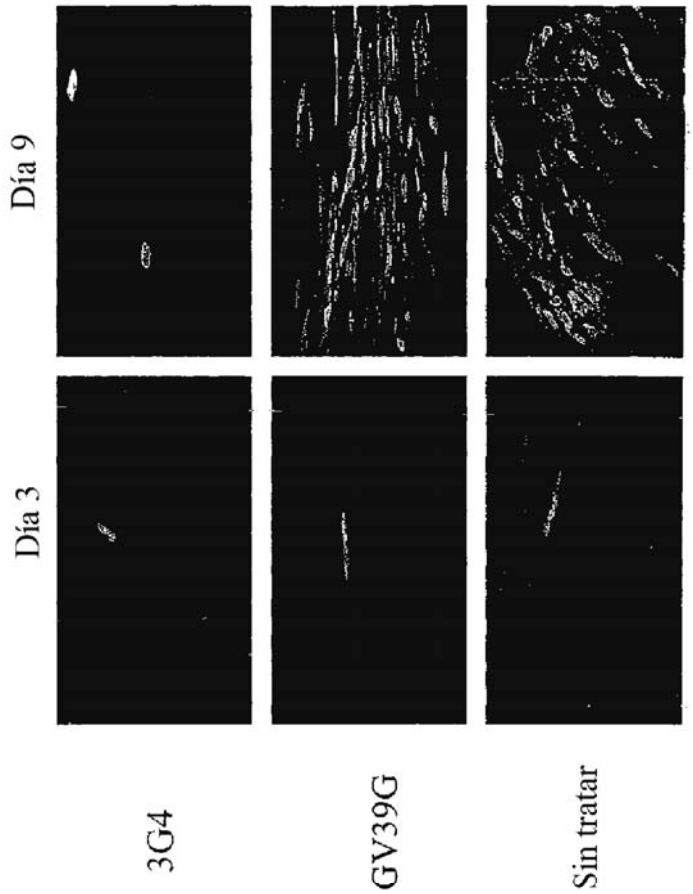


FIG. 9B

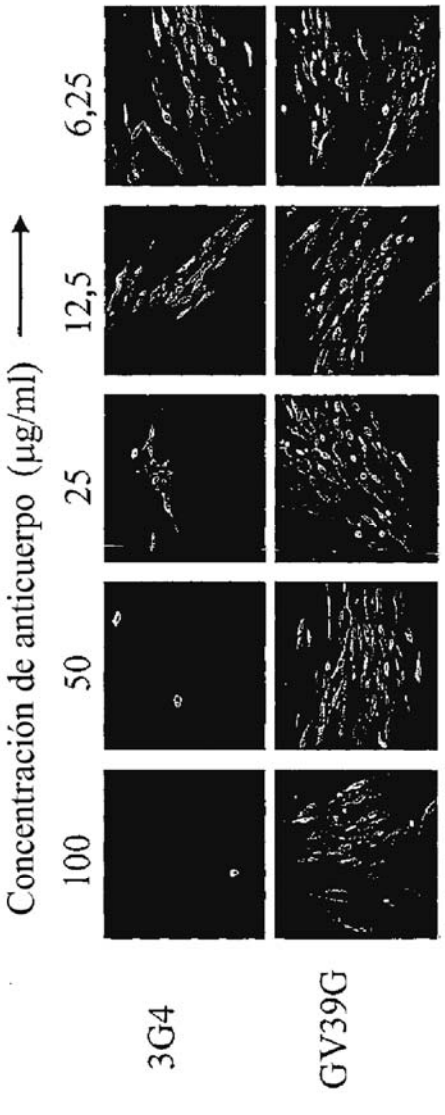

Concentración de anticuerpo (µg/ml)
100
50
25
12,5
6,25
3G4
GV39G
Sin tratar

FIG. 10

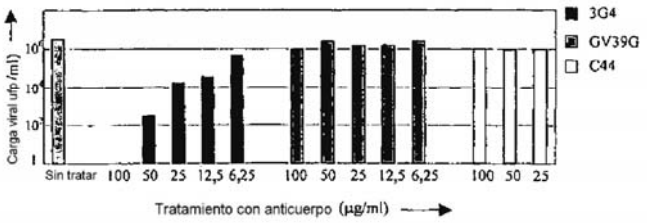


FIG. 11A

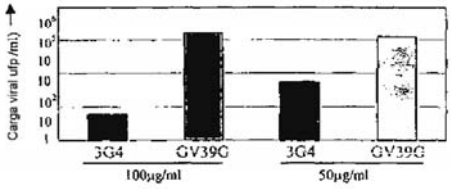


FIG. 11B

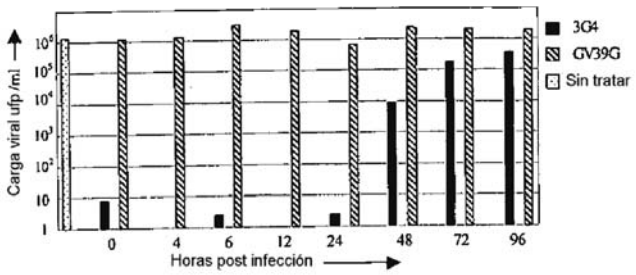

Carga viral ufp /ml
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10
1
0
4
6
12
24
48
72
96
Horas post infección
3G4
GV39G
Sin tratar

FIG. 11C

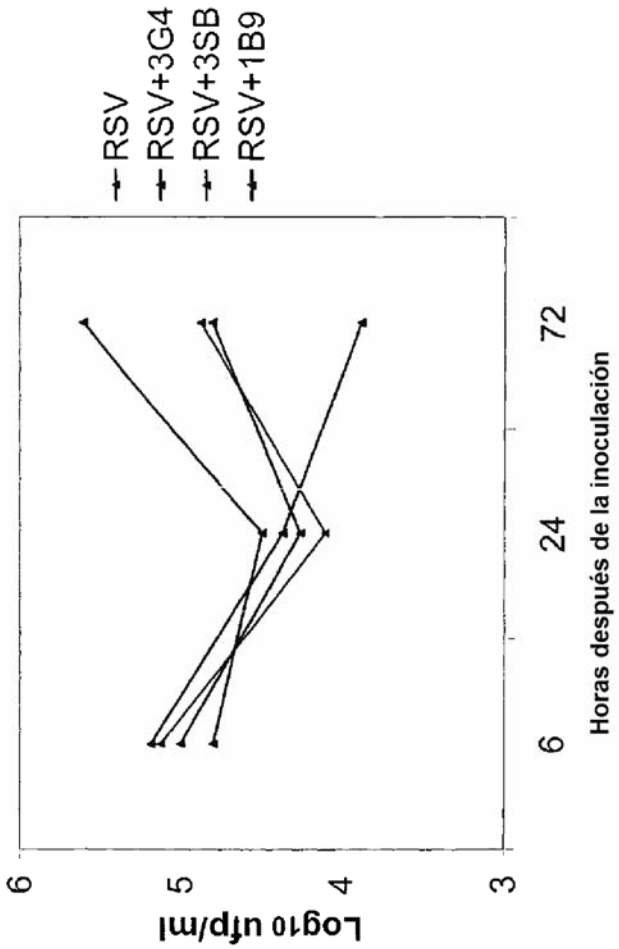

RSV
RSV+3G4
RSV+3SB
RSV+1B9
Log10 ufp/ml
6
5
4
3
6
24
72
Horas después de la inoculación

FIG. 12

FIG. 13A. DLB Duramicina — NH . CO . $(CH_2)_5$. NH .CO— biotina

FIG. 13B. DIB Duramicina — NH . C . $(CH_2)_3$. S . CH_2 . CO . NH . $(CH_2)_6$. NH . CO —biotina

$^{+}NH_2 . \bar{C}l$

FIG. 13C. $(DLB)_4NA$

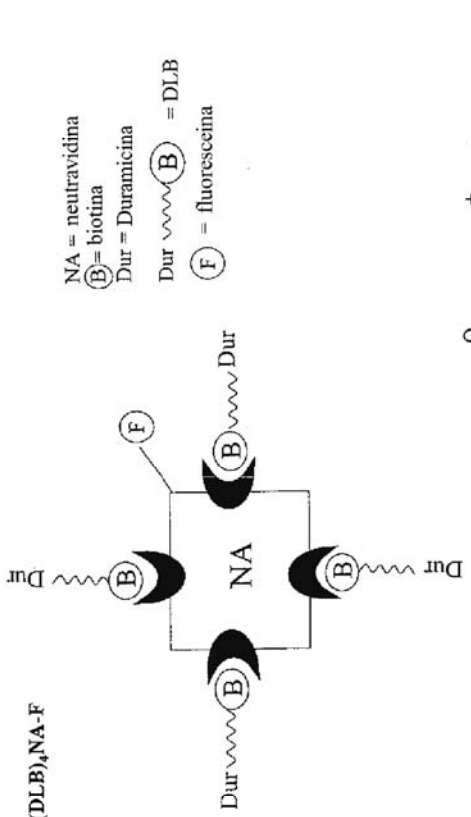


FIG. 13D. $(DLB)_4NA$-F

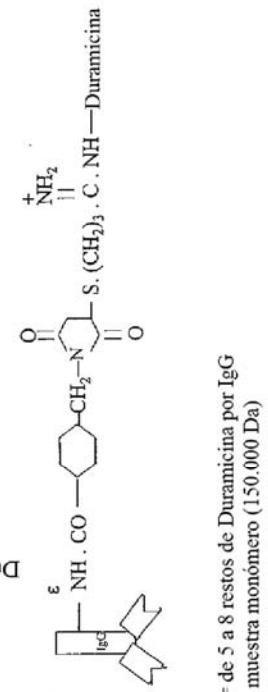
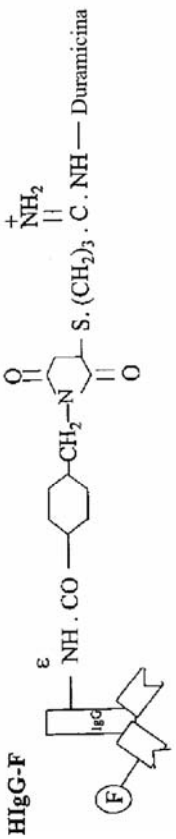


FIG. 13E. $(DIM)_n$ HIgG

n = de 5 a 8 restos de Duramicina por IgG
Se muestra monómero (150.000 Da)

FIG. 13F. $(DIM)_n$ HIgG-F

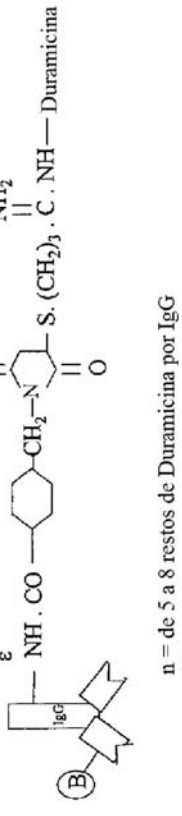


n = de 5 a 8 restos de Duramicina por IgG

(F) = fluoresceína

Se muestra monómero (150.000 Da)

FIG. 13G. $(DIM)_n$ HIgG-B



n = de 5 a 8 restos de Duramicina por IgG

(B) = biotina

Se muestra monómero (150.000 Da)

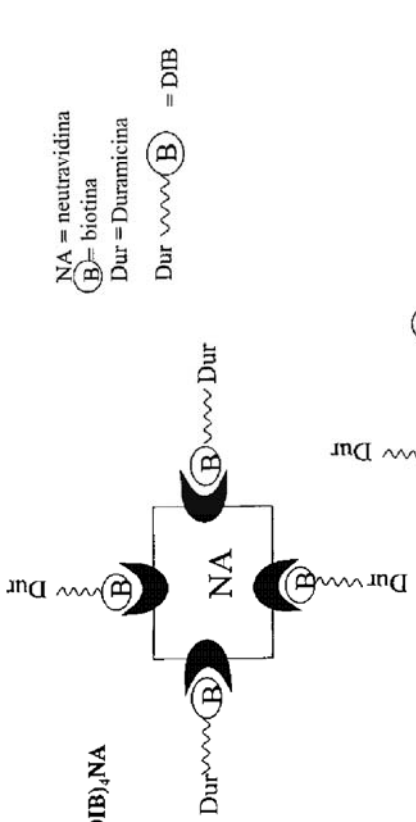


FIG. 13H. $(DIB)_4NA$

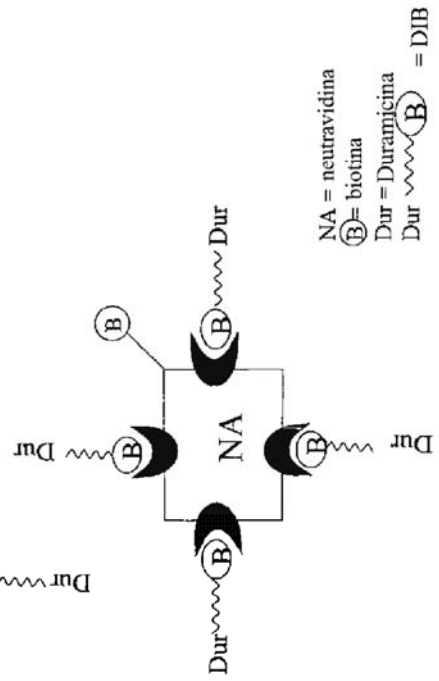


FIG. 13I. $(DIB)_4NA\text{-}B$

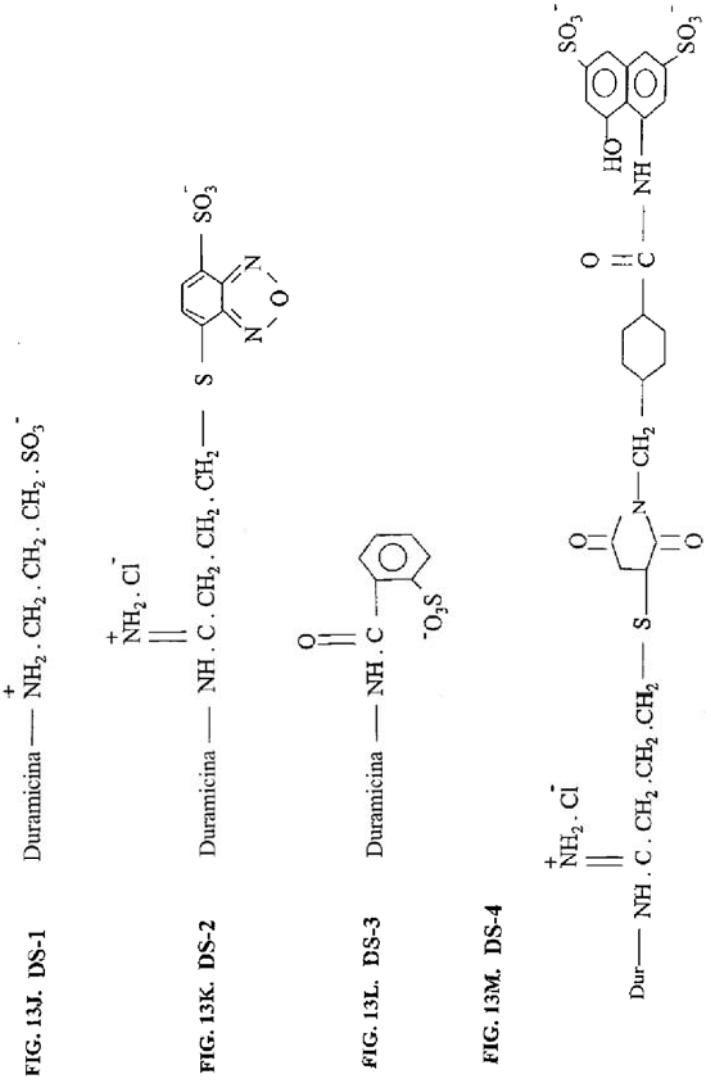

Duramicina — NH2+ . CH2 . CH2 . CH2 . SO3-
FIG. 13J. DS-1
Duramicina — NH2+ . Cl- || NH . C . CH2 . CH2 . CH2 — S
SO3-
FIG. 13K. DS-2
Duramicina — NH . C || O
-O3S
FIG. 13L. DS-3
Dur — NH2+ . Cl- || NH . C . CH2 . CH2 . CH2 — S
SO3-
SO3-
HO
NH
FIG. 13M. DS-4

FIG. 13N. DS-5

FIG. 13O. DC-1

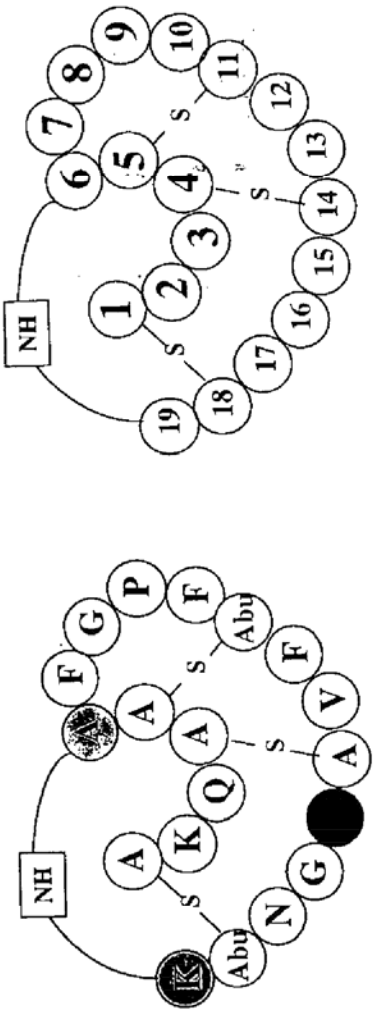
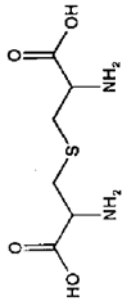

NH
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
S
S
S
NH
A
K
Q
A
A
F
G
P
F
Abu
F
V
A
G
N
Abu
S
S
S

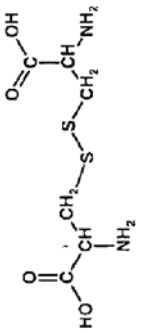
FIG. 13P

Lantionina

Ala-S-Ala

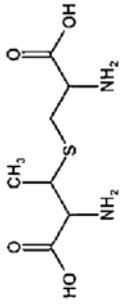


cistina



β-metil-lantionina

Abu-S-Ala



Lisinoalanina

Ala-NH-Lys

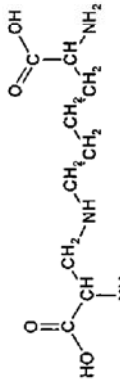
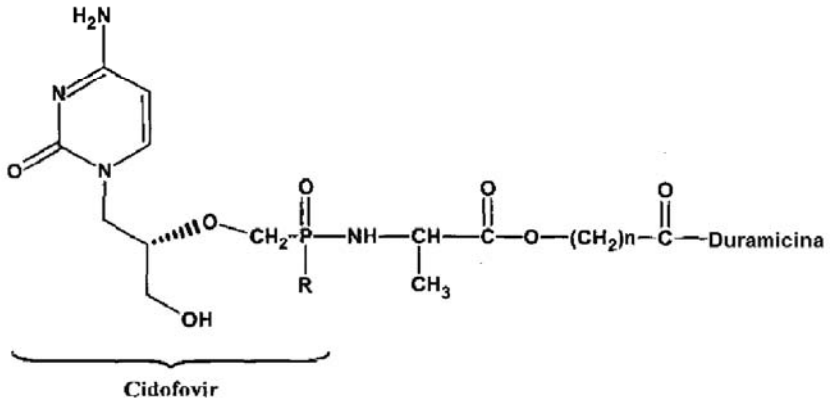


FIG. 13Q

FIG. 13R



R = OH, como en el cidofovir o grupo hidrófobo lábil

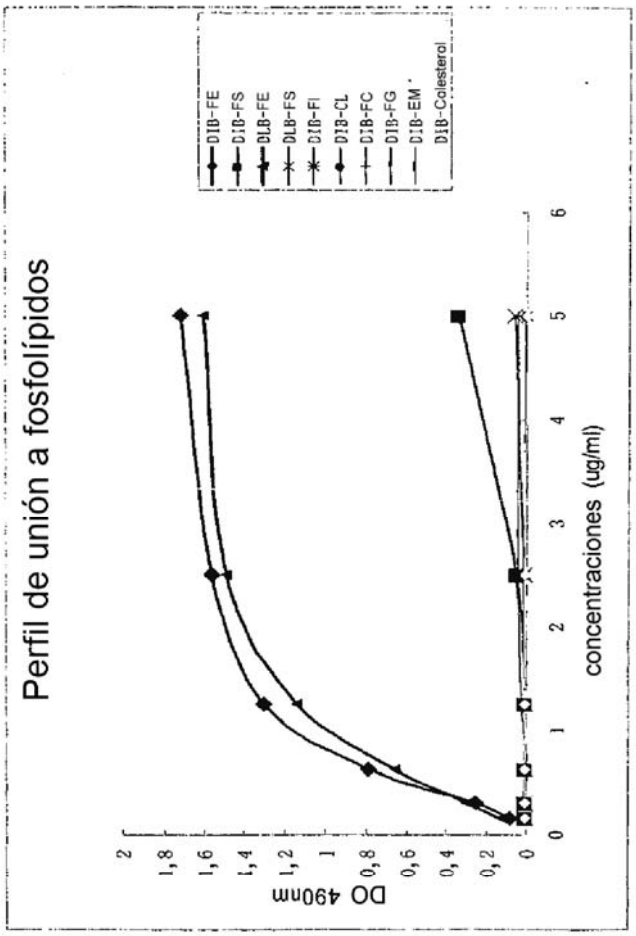

Perfil de unión a fosfolípidos
DIB-FE
DIB-FS
DLB-FE
DLB-FS
DIB-FI
DIB-CL
DIB-FC
DIB-FG
DIB-EM
DIB-Colesterol
DO 490nm
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
1,2
1,4
1,6
1,8
2
0
1
2
3
4
5
6
concentraciones (ug/ml)

FIG. 14A

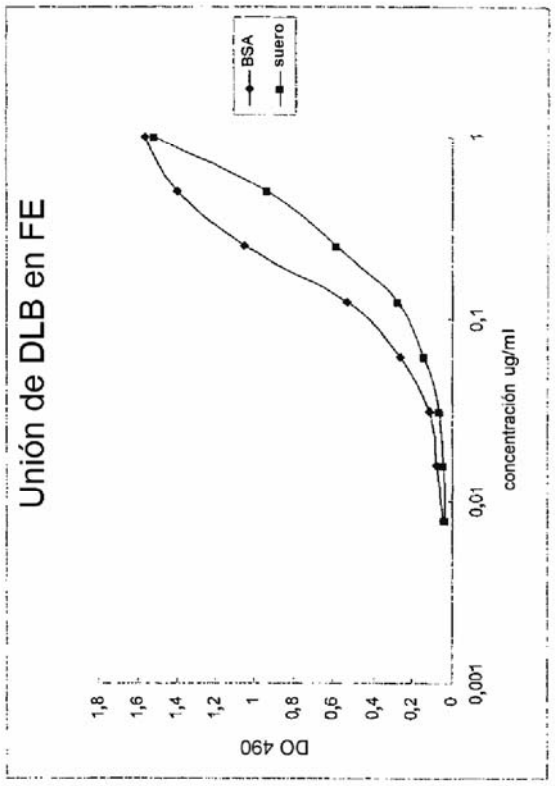

Unión de DLB en FE
BSA
suero
DO 490
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,001
0,01
0,1
1
concentración ug/ml

FIG. 14B

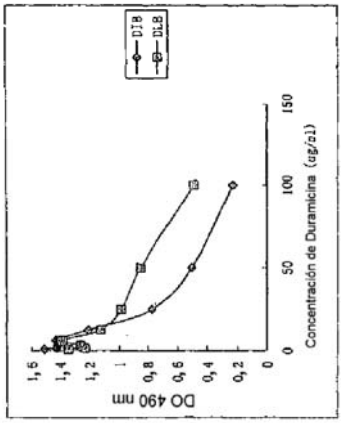


FIG. 14D

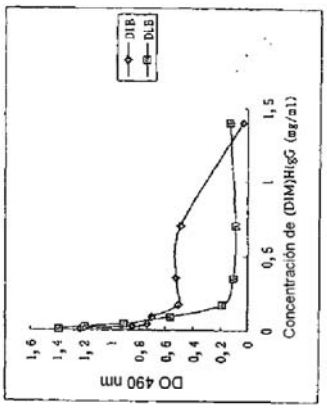


FIG. 14C

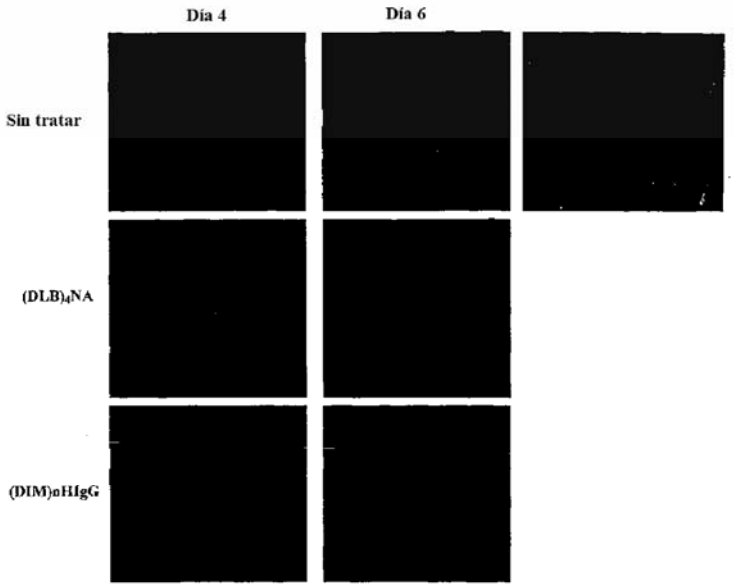


FIG. 15

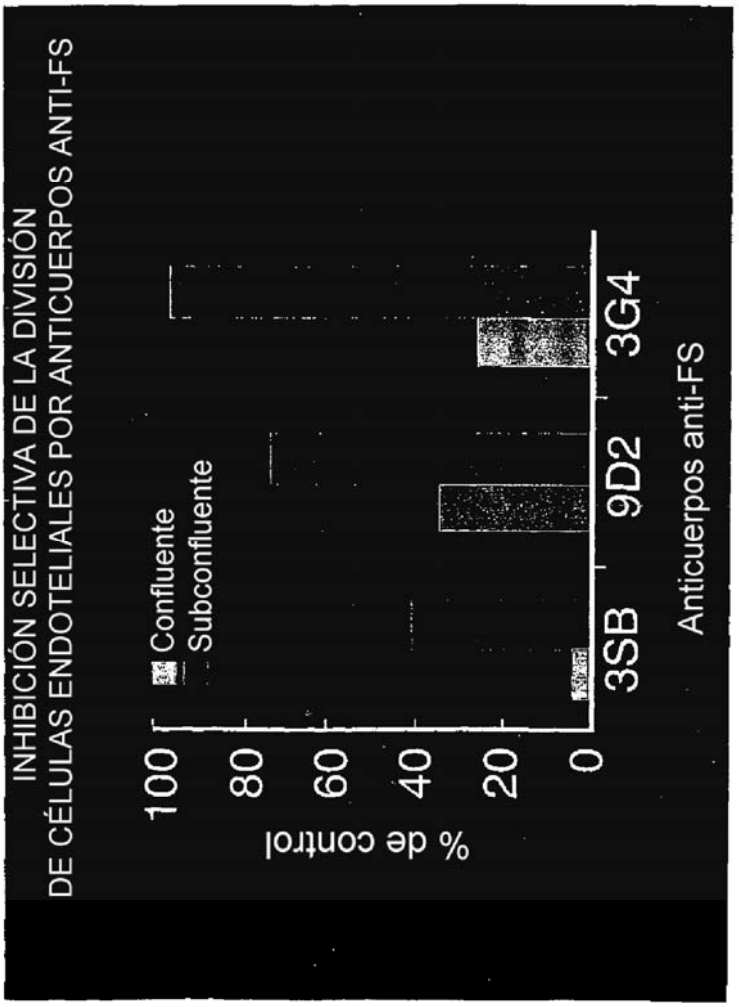

INHIBICIÓN SELECTIVA DE LA DIVISIÓN
DE CÉLULAS ENDOTELIALES POR ANTICUERPOS ANTI-FS
Confluente
Subconfluente
% de control
100
80
60
40
20
0
3SB
9D2
3G4
Anticuerpos anti-FS

FIG. 16

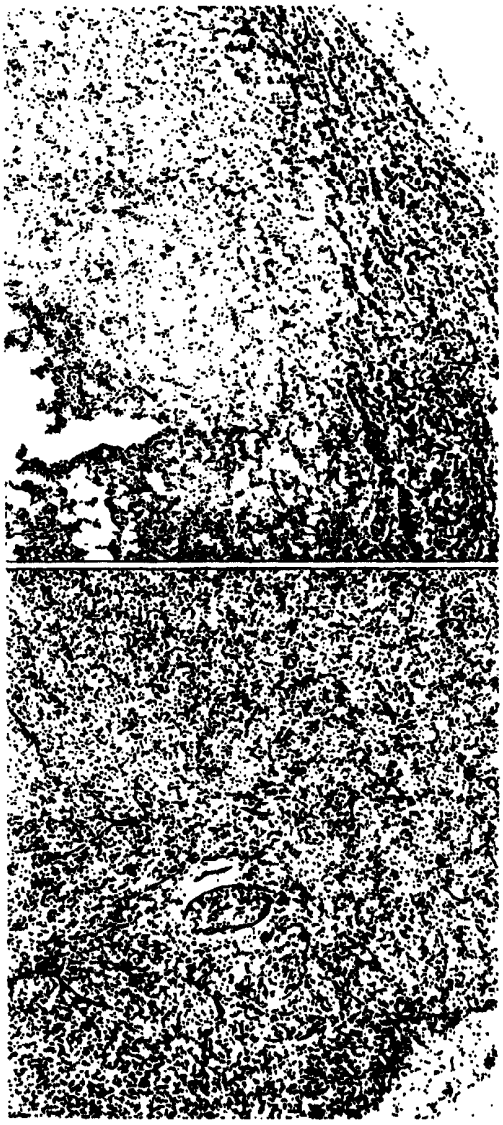


FIG. 17A

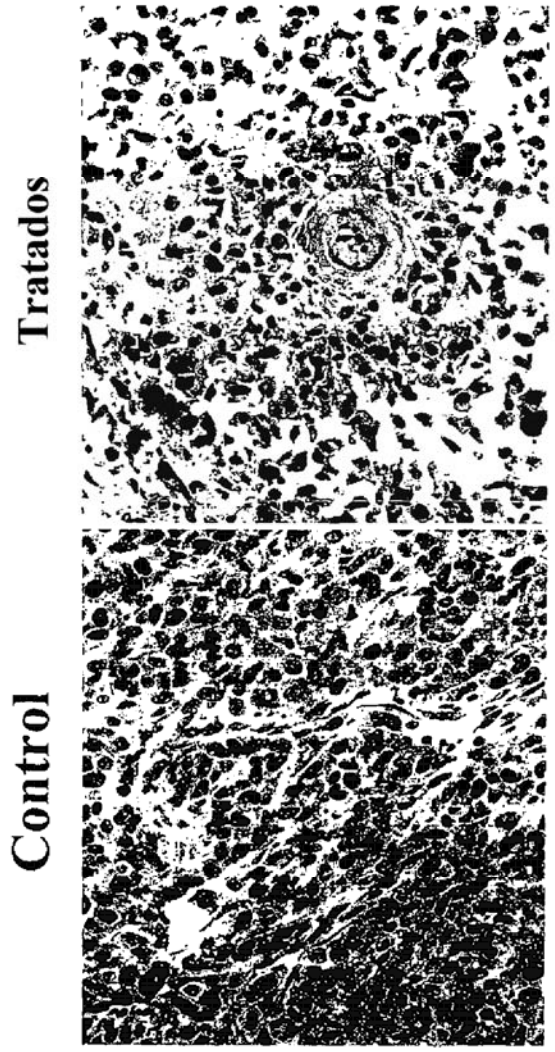
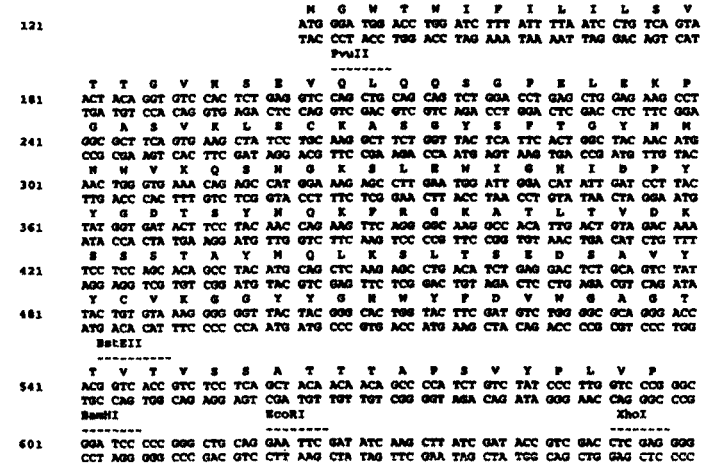


FIG. 17B

FIG. 18A

Secuencia original 3G4-2BVH:



El producto RACE 3G4-2BVH se clona e injerta en la región constante humana γI en el sitio BstEII. De esta manera, éste contiene la secuencia líder de ratón y su VH está unida a la secuencia CH1 humana de la siguiente manera: líder/3G4VH/VSS-AST...

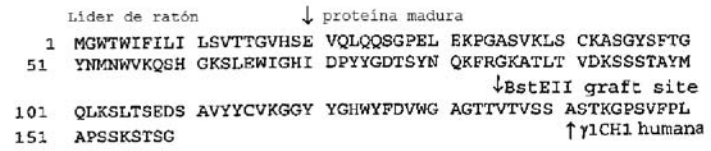


FIG. 18B

Secuencia original 3G4-2BVL:

```
                                                                  M   D   M   R   A
 61                                                               ATG GAC ATG AGG GCT
                                                                  TAC CTG TAC TCC CGA
       P   A   Q   I   L   G   F   L   L   L   L   F   P   G   T   R   C   D   I   Q
121    CCT GCA CAG ATT TTG GGC TTC TTG TTG CTC TTG TTT CCA GGT ACC AGA TGT GAC ATC CAG
       GGA CGT GTC TAA AAC CCG AAG AAC AAC GAG AAC AAA GGT CCA TGG TCT ACA CTG TAG GTC
       M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   L   G   E   R   V   S   L   T   C
161    ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC TTA TCT GCC TCT CTG GGA GAA AGA GTC AGT CTC ACT TGT
       TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGG AAT AGA CGG AGA GAC CCT CTT TCT CAG TCA GAG TGA ACA
       R   A   S   Q   D   I   G   S   S   L   N   W   L   Q   Q   G   P   D   G   T
241    CGG GCA AGT CAG GAC ATT GGT AGT AGC TTA AAC TGG CTT CAG CAG GGA CCA GAT GGA ACT
       GCC CGT TCA GTC CTG TAA CCA TCA TCG AAT TTG ACC GAA GTC GTC CCT GGT CTA CCT TGA
       I   K   R   L   I   Y   A   T   S   S   L   D   S   G   V   P   K   R   F   S
301    ATT AAA CGC CTG ATC TAC GCC ACA TCC AGT TTA GAT TCT GGT GTC CCC AAA AGG TTC AGT
       TAA TTT GCG GAC TAG ATG CGG TGT AGG TCA AAT CTA AGA CCA CAG GGG TTT TCC AAG TCA
       G   S   R   S   G   S   D   Y   S   L   T   I   S   S   L   E   S   E   D   F
361    GGC AGT AGG TCT GGG TCA GAT TAT TCT CTC ACC ATC AGC AGC CTT GAG TCT GAA GAT TTT
       CCG TCA TCC AGA CCC AGT CTA ATA AGA GAG TGG TAG TCG TCG GAA CTC AGA CTT CTA AAA
       V   D   Y   Y   C   L   Q   Y   V   S   S   P   P   T   F   G   A   G   T   K
421    GTA GAC TAT TAC TGT CTA CAA TAT GTT AGT TCT CCT CCC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG
       CAT CTG ATA ATG ACA GAT GTT ATA CAA TCA AGA GGA GGG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTC
                                          BbsI                BamHI
                                          -------             --------
       L   E   L   K   R   A   D   A   A   P   T   V   F   I   F   G   R   I   P
481    CTG GAG CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTC TTC ATC TTC GGG CGG ATC CCC CGG
       GAC CTC GAC TTT GCC CGA CTA CGA CGT GGT TGA CAG AAG TAG AAG CCC GCC TAG GGG GCC
```

El producto RACE 3G4-2BVL se injerta a la región constante κ humana en el sitio BbsI. De esta manera, éste contiene la secuencia líder de ratón y su VL está unida a la secuencia CL1 humana de la siguiente manera: líder/3G4 -VL/TVF-IFP...

```
        Líder de ratón          ↓proteína madura
  1  MDMRAPAQIL GFLLLLFPGT RCDIQMTQSP SSLSASLGER VSLTCRASQD
 51  IGSSLNWLQQ GPDGTIKRLI YATSSLDSGV PKRFSGSRSG SDYSLTISSL
                                  FR4↓          ↓BbsI graft site
101  ESEDFVDYYC LQYVSSPPTF GAGTKLELKR ADAAPTVF IFPPSDEQLKSGTAS
                                                ↑constante kappa humana
```

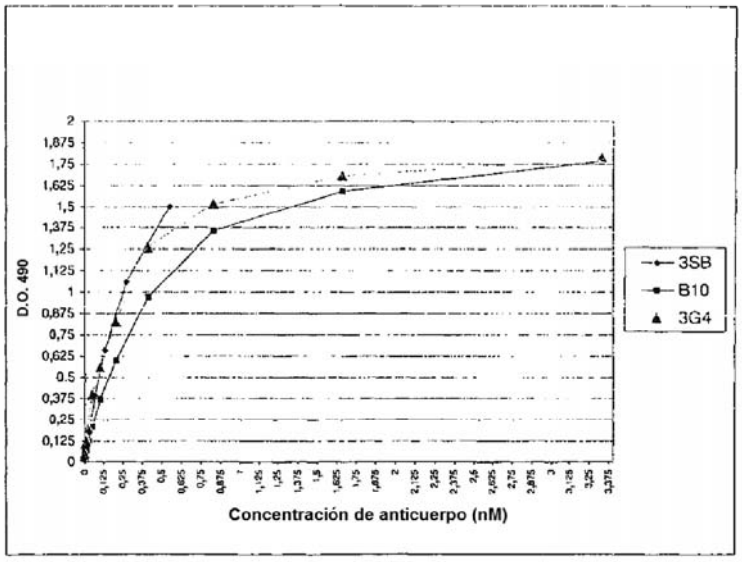


FIG. 19A

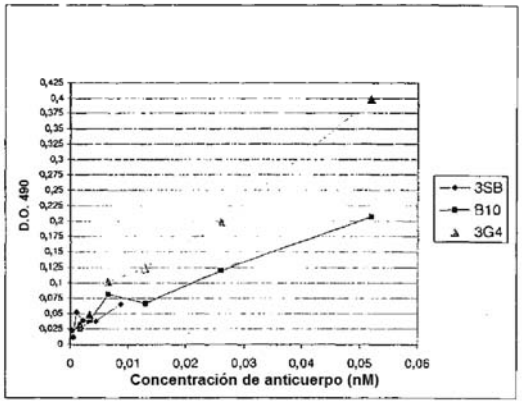

D.O. 490
0,425
0,4
0,375
0,35
0,325
0,3
0,275
0,25
0,225
0,2
0,175
0,15
0,125
0,1
0,075
0,05
0,025
0
0
0,01
0,02
0,03
0,04
0,05
0,06
Concentración de anticuerpo (nM)
3SB
B10
3G4

FIG. 19B

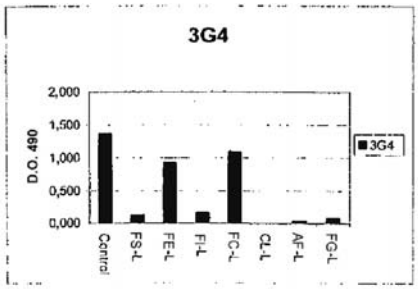

3G4
D.O. 450
2,000
1,500
1,000
0,500
0,000
3G4
Control
FS-L
FE-L
FI-L
FC-L
CL-L
AF-L
FG-L

FIG. 20

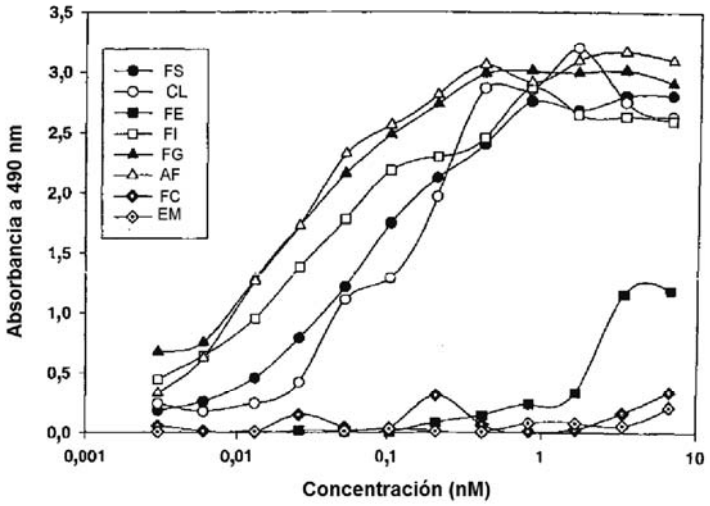

3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Absorbancia a 490 nm
FS
CL
FE
FI
FG
AF
FC
EM
0,001
0,01
0,1
1
10
Concentración (nM)

FIG. 21

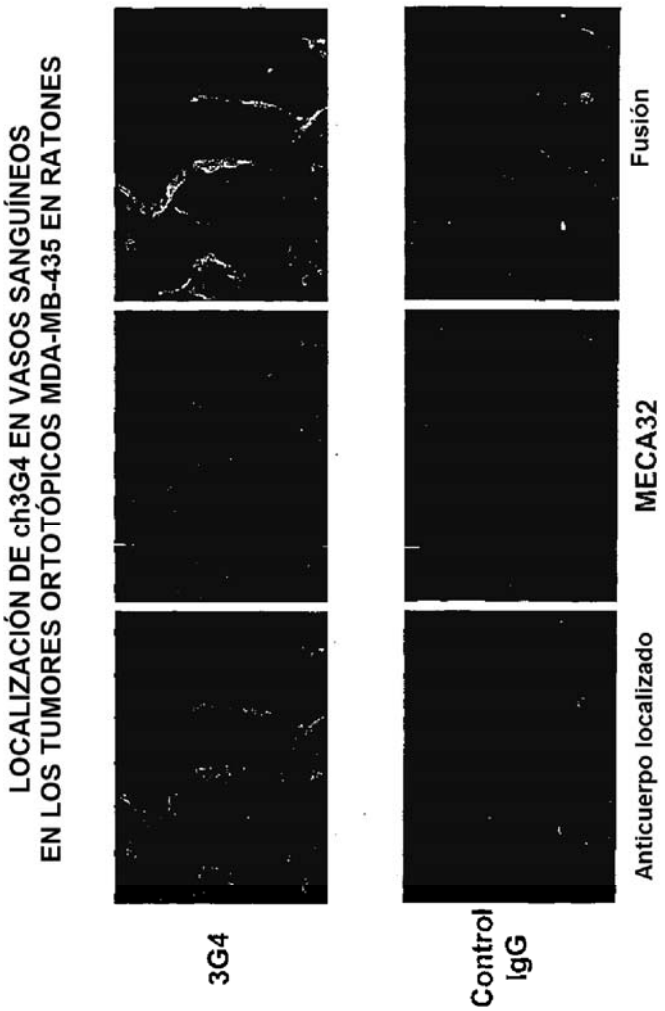

LOCALIZACIÓN DE ch3G4 EN VASOS SANGUÍNEOS
EN LOS TUMORES ORTOTÓPICOS MDA-MB-435 EN RATONES
3G4
Control IgG
Anticuerpo localizado
MECA32
Fusión

FIG. 22

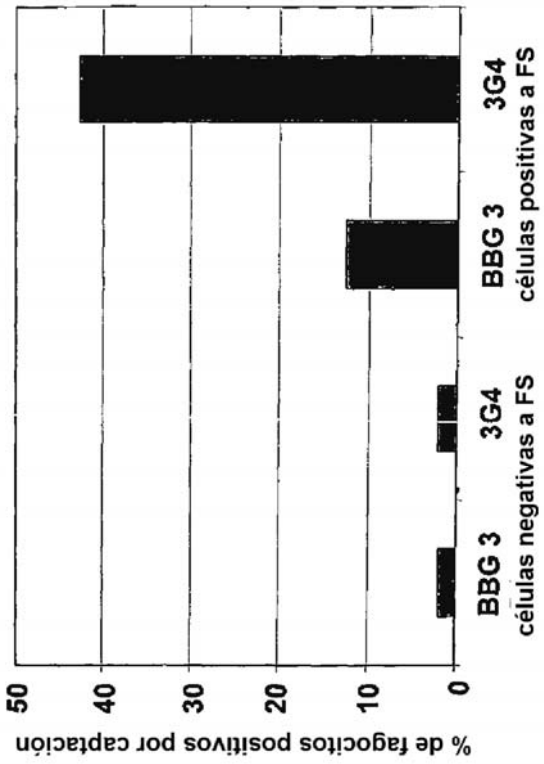

% de fagocitos positivos por captación
50
40
30
20
10
0
BBG 3
3G4
células negativas a FS
BBG 3
3G4
células positivas a FS

FIG. 23

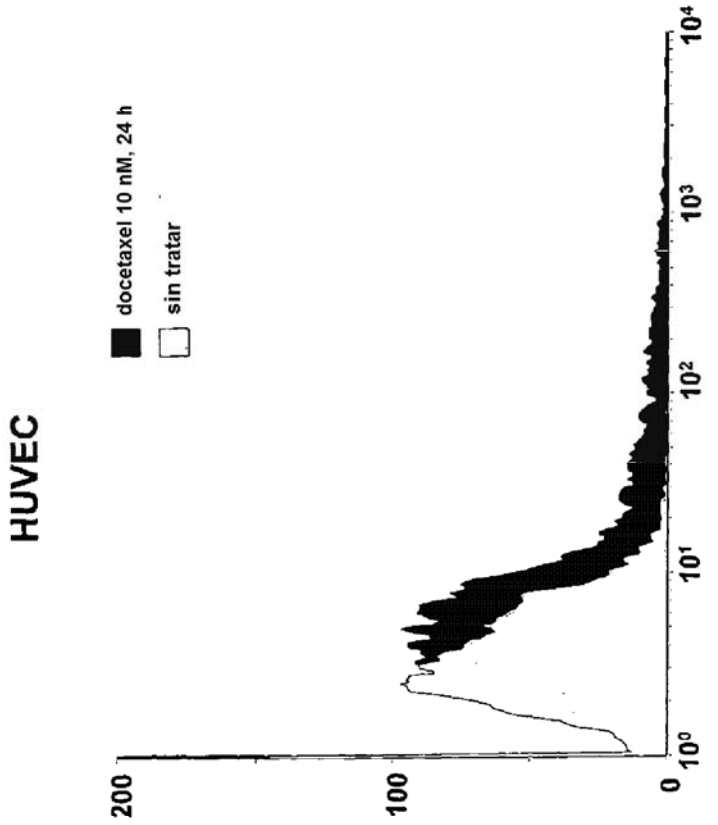

HUVEC
docetaxel 10 nM, 24 h
sin tratar
200
100
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 24A

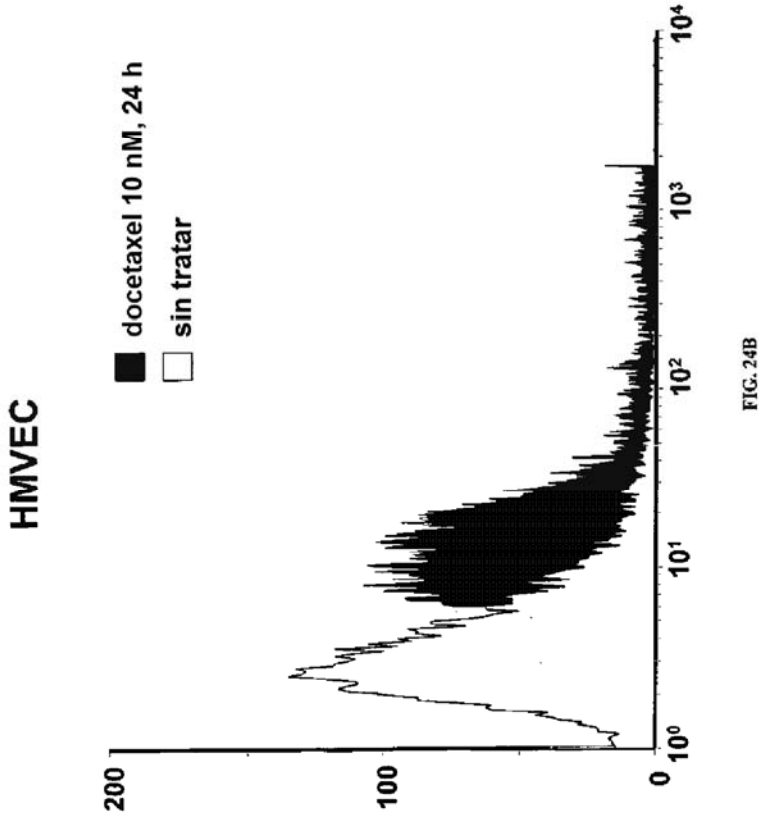

HMVEC
docetaxel 10 nM, 24 h
sin tratar
200
100
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 24B

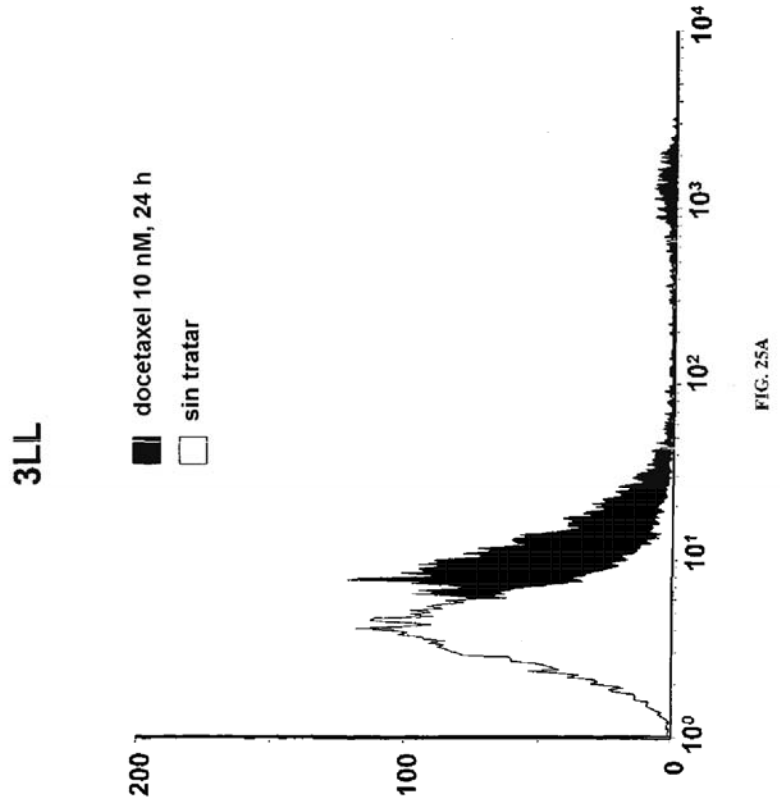

3LL
docetaxel 10 nM, 24 h
sin tratar
200
100
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 25A

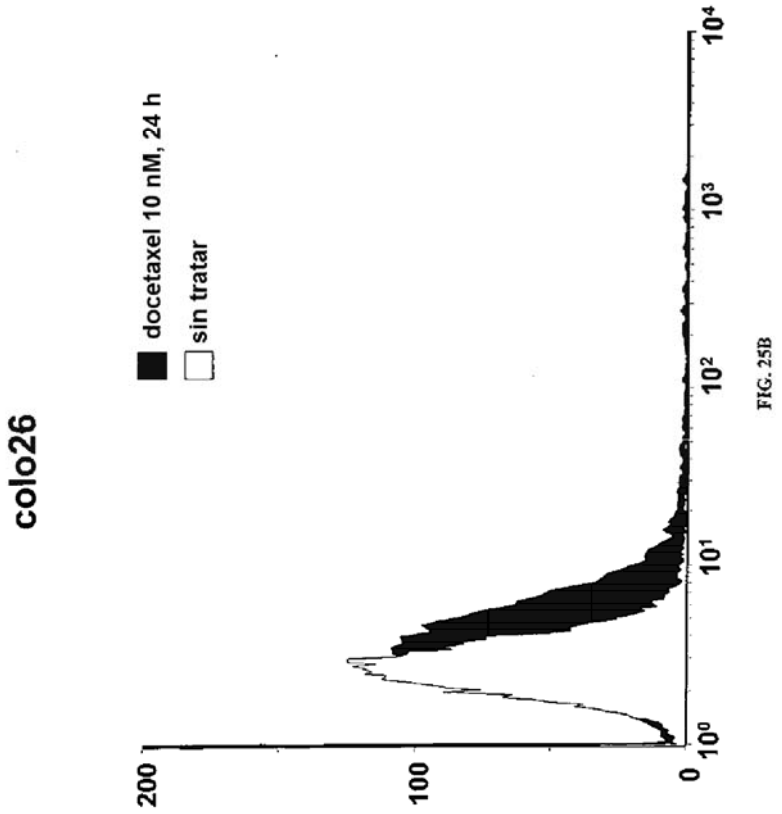

colo26
docetaxel 10 nM, 24 h
sin tratar
200
100
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 25B

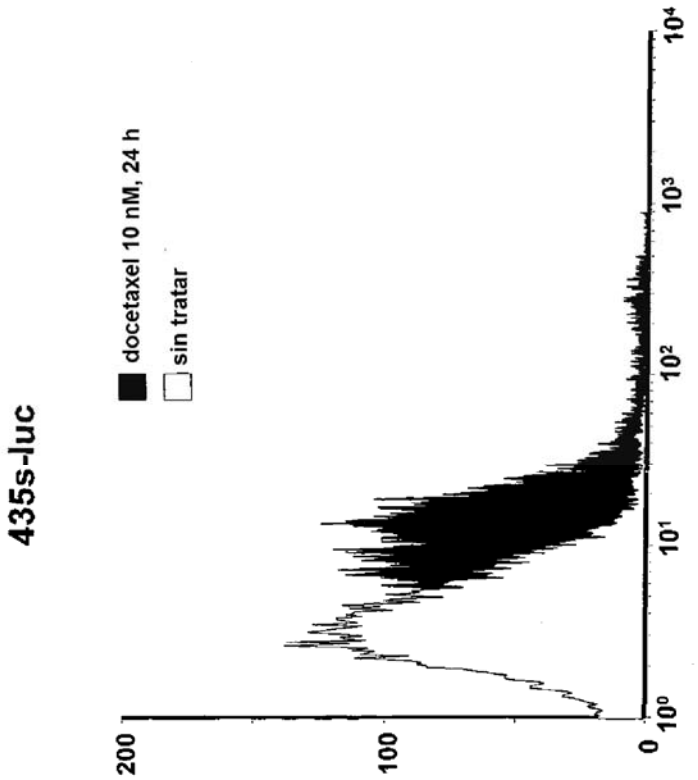

435s-luc
docetaxel 10 nM, 24 h
sin tratar
200
100
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 25C

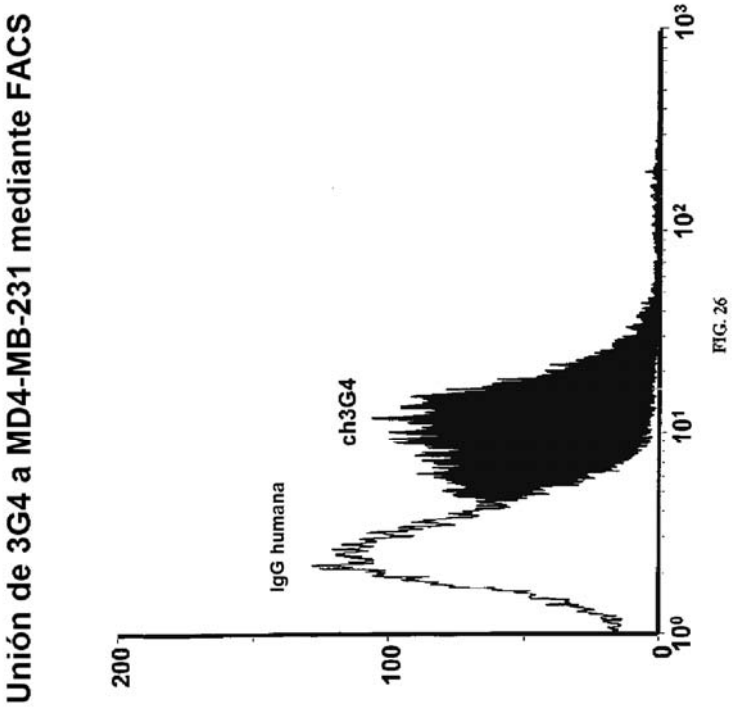

Unión de 3G4 a MD4-MB-231 mediante FACS
200
100
0
IgG humana
ch3G4
10⁰
10¹
10²
10³

FIG. 26

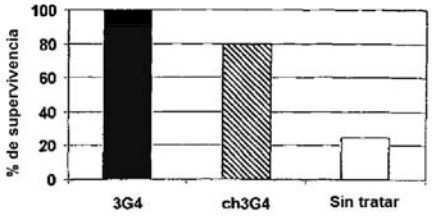


FIG. 27

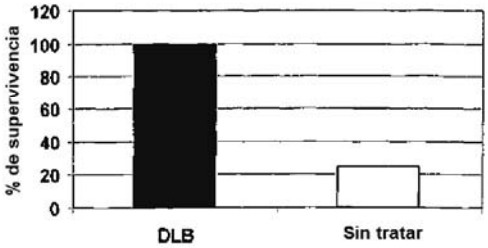


FIG. 28

FIG. 29A

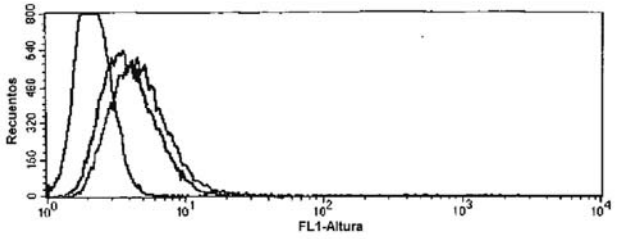
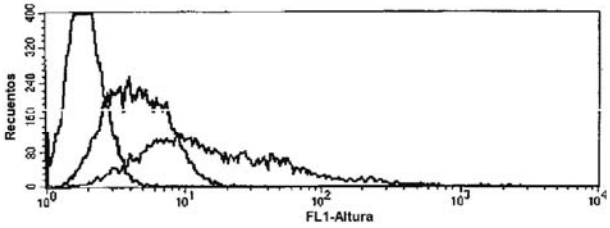


FIG. 29B



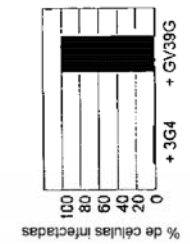


FIG. 30D

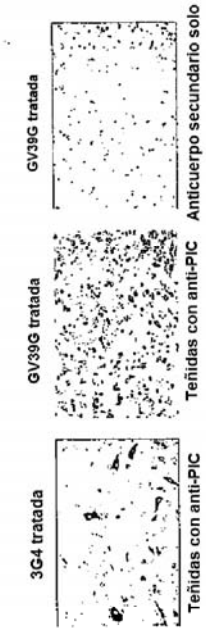


FIG. 30A FIG. 30B FIG. 30C

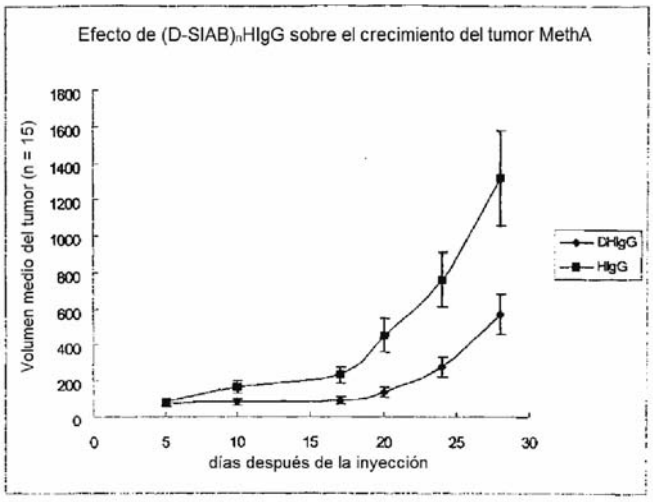

Efecto de (D-SIAB)nHIgG sobre el crecimiento del tumor MethA
Volumen medio del tumor (n = 15)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
días después de la inyección
DHIgG
HIgG

FIG. 31

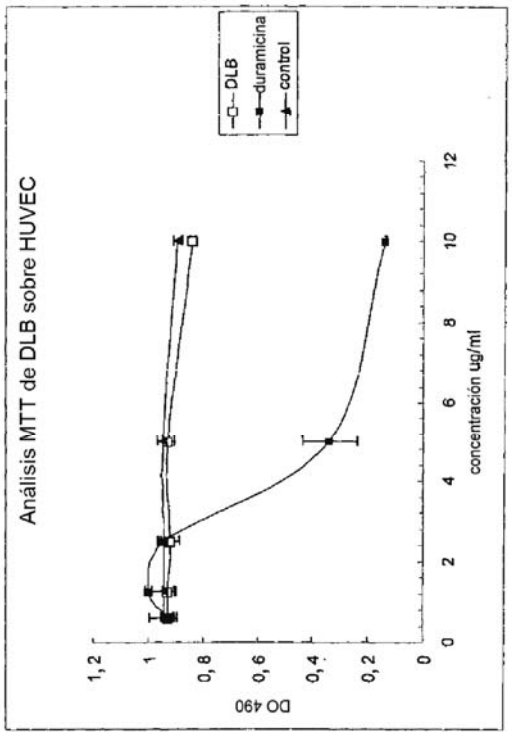

Análisis MTT de DLB sobre HUVEC
DLB
duramicina
control
DO 490
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
2
4
6
8
10
12
concentración ug/ml

FIG. 32

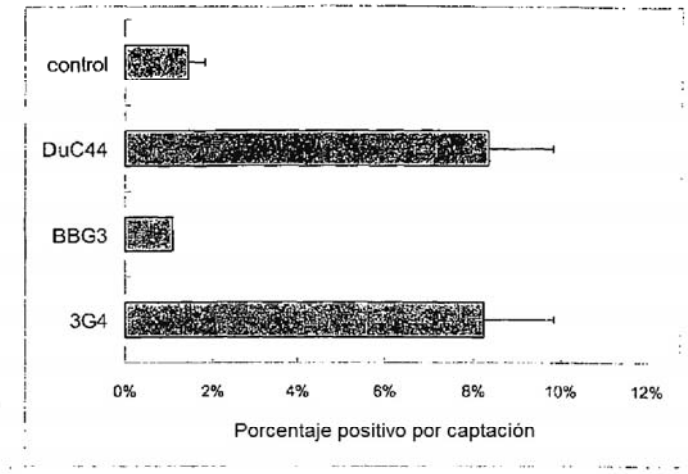

control
DuC44
BBG3
3G4
0%
2%
4%
6%
8%
10%
12%
Porcentaje positivo por captación

FIG. 33