

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 255**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.1999 E 04007843 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 1520588**

54 Título: **Utilización de anticuerpos anti-aminofosfolípidos para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

13.07.1998 US 92672 P

02.12.1998 US 110608 P

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

08.04.2015

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM (100.0%)**

**OFFICE OF THE GENERAL COUNSEL, 201 WEST
7TH STREET
AUSTIN, TEXAS 78701, US**

72 Inventor/es:

**THORPE, PHILIP E. y
RAN, SOPHIA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 533 255 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Utilización de anticuerpos anti-aminofosfolípidos para el tratamiento del cáncer

Antecedentes de la invención

1. Sector técnico al que pertenece la invención

5 La presente invención hace referencia en general a los vasos sanguíneos y a la biología de los tumores. Más particularmente, abarca los descubrimientos sorprendentes de que los aminofosfolípidos, tales como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina, son marcadores específicos y estables de vasos sanguíneos de tumores y que la administración de anticuerpos anti-aminofosfolípidos solos es suficiente para inducir trombosis y regresión del tumor. La invención proporciona, por lo tanto, métodos y compuestos seguros y eficaces para el ataque específico y destrucción de vasos sanguíneos de tumores y para el tratamiento de tumores sólidos. La utilización de anticuerpos no conjugados anti-fosfatidilserina es una ventaja específica, si bien la invención proporciona diferentes compuestos eficaces y combinaciones de los mismos.

2. Descripción de las técnicas relacionadas

15 La resistencia de las células de los tumores a los agentes quimioterapéuticos representa un problema significativo en la oncología clínica. De hecho, ésta es una de las principales razones por las que muchas de las formas más prevalentes de cáncer humano todavía resisten la intervención quimioterapéutica efectiva, a pesar de ciertos avances en el campo de la quimioterapia.

20 Un problema significativo que se presenta en los regímenes de tratamiento de tumores es el deseo de una eliminación total celular. Esto significa que los regímenes de tratamiento más efectivos se acercan más a una eliminación de células total de todas las células malignas conocidas como clonogénicas, es decir, células que tienen la capacidad para crecer incontroladas y reemplazar cualquier masa de tumor que podría haber sido eliminada por la terapia. Debido a la meta de desarrollar tratamientos que se acerquen a una eliminación de células total, ciertos tipos de tumores han sido más dóciles a la terapia que otros. Por ejemplo, los tumores de tejidos blandos, por ejemplo, linfomas, y los tumores de la sangre y de los órganos que forman la sangre, por ejemplo, leucemias, generalmente han respondido mejor a la terapia de quimioterapia que los tumores sólidos tales como los carcinomas.

30 Una razón para la susceptibilidad de los tumores blandos y basados en sangre para la quimioterapia es la mayor accesibilidad del linfoma y de las células leucémicas a la intervención quimioterapéutica. Simplemente, es mucho más difícil para la mayoría de las sustancias o agentes quimioterapéuticos alcanzar todas las células de una masa de tumor sólido de lo que es alcanzar los tumores blandos y los tumores basados en sangre, y por lo tanto mucho más difícil lograr una eliminación total de células. El aumentar la dosis de agentes quimioterapéuticos frecuentemente da como resultado efectos secundarios tóxicos, que generalmente limitan la efectividad de los agentes antitumorales convencionales.

35 Otra estrategia de tratamiento de tumores es el uso de una inmunotoxina, en la cual se usa un anticuerpo de células antitumoral para administrar toxina a las células del tumor. Sin embargo, en común con los enfoques quimioterapéuticos descritos anteriormente, la terapia de inmunotoxinas también padece algunas desventajas significativas. Por ejemplo, las células antígeno-negativas o deficientes de antígeno pueden sobrevivir y volver a poblar el tumor o conducir a otras metástasis. También, en el tratamiento de tumores sólidos, la masa del tumor generalmente es impermeable a moléculas del tamaño de anticuerpos e inmunotoxinas. Tanto las distancias de difusión física como la presión intersticial dentro del tumor son limitaciones significativas a este tipo de terapia.

45 Una estrategia más reciente ha sido la de atacar la vasculatura de los tumores sólidos. Al tener como objetivo los vasos sanguíneos de los tumores, en vez de las mismas células de los tumores, tiene ciertas ventajas porque no es probable que ello conduzca al desarrollo de células de tumor resistentes, y porque las células objetivo son fácilmente accesibles. Más aún, la destrucción de los vasos sanguíneos conduce a la amplificación del efecto antitumor, ya que muchas células de los tumores dependen de un solo vaso para su oxígeno y nutrientes (Denekamp, 1990) . Se describen estrategias de ataque vascular efectivas en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica números 5.855.866 y 5.965.132, que particularmente describen la administración dirigida de agentes anticelulares y toxinas a la vasculatura de los tumores.

50 Otra versión efectiva del enfoque del ataque vascular es dirigir un factor de coagulación a la vasculatura del tumor (Huang y otros, 1997; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica números 5.877.289, 6.004.555 y 6.093.399. La utilización de anticuerpos y otros agentes de direccionado para suministrar coagulantes a la vasculatura de tumores tiene las ventajas adicionales de inmunogenicidad reducida e incluso un riesgo más bajo de efectos secundarios tóxicos. Como se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.877.289, un factor de coagulación preferente para su uso en estos trombógenos específicos de tumores, o coagulandos, es una versión truncada de la proteína que induce a la coagulación humana, el factor de tejido (TF) . El factor de tejido (TF) es el iniciador más importante de la coagulación de la sangre (Ruf y otros, 1991; Edgington y otros, 1991; Ruf y Edgington, 1994) . El tratamiento de ratones que tienen tumores con estos coagulandos da como resultado una

necrosis significativa del tumor e incluso la regresión completa del tumor en muchos animales (Huang y otros, 1997; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.877.289, 6.004.555 y 6.093.399) .

Fishman y otros, Int. J. Oncol., Vol. 10, p901-904 (1997) se refieren al posible ataque de células cancerígenas, utilizando anticuerpos producidos en enfermedades autoinmunes.

5 Aunque la administración específica de agentes terapéuticos, tales como los agentes anticelulares, toxinas y factores de coagulación, a los vasos del tumor representa un avance significativo en los protocolos de tratamiento de tumor, todavía hay lugar para terapias de ataque vascular adicionales o incluso alternativas. La identificación de objetivos adicionales para permitir la destrucción de los vasos de tumores específicos *in vivo* naturalmente sería beneficioso al extender el número de opciones objetivo. Más particularmente, tal como en los constructos de ataque vascular anteriormente descritos y coagulandos, se dispone de sistemas de dos componentes que comportan el agente de ataque y la parte efectiva, el desarrollo de un agente componente para la destrucción de la vasculatura del tumor representaría un progreso importante. En caso de que la preparación de este tipo de agentes se demostrara posible, ello aceleraría también probablemente el progreso de la terapia anti-vascular para el ámbito clínico, dada la simplicidad del nuevo agente terapéutico.

15 La presente invención se propone resolver las carencias de la técnica anterior al dar a conocer una nueva utilización de un anticuerpo o antígeno anti-aminofosfolípido que une un fragmento del mismo para la destrucción específica del tumor. La invención se basa en parte en el descubrimiento de que los aminofosfolípidos, tales como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina, son marcadores accesibles y utilizables de manera estable de los vasos de los tumores. Más particularmente, la invención incorpora el sorprendente descubrimiento de que los anticuerpos desnudos contra componentes aminofosfolípidos son capaces de inducir específicamente destrucción de los vasos sanguíneos de los tumores y necrosis de los tumores *in vivo*.

20 En un primer aspecto de la presente invención se proporciona una composición que comprende una cantidad biológicamente efectiva de un anticuerpo anti-aminofosfolípido o región de unión al antígeno del mismo, para el tratamiento del cáncer por exterminio de las células endoteliales vasculares tumorales de un tumor vascularizado, que induce la coagulación en la vasculatura tumoral o que destruye la vasculatura tumoral.

Como característica sorprendente que subyace en la invención se puede indicar la translocación de aminofosfolípidos, tales como PS, a las células endoteliales vasculares de la superficie del tumor tiene lugar, como mínimo de una manera significativa, con independencia de los daños en las células o de los mecanismos apoptóticos u otros de muerte celular. Por lo tanto, la expresión superficial PS en el medio del tumor no es una consecuencia de la muerte y destrucción celular o un inicio de la misma, sino que tiene lugar en células endoteliales vasculares morfológicamente intactas. Esto significa que la expresión PS no es transitoria, sino que es suficientemente estable para proporcionar un objetivo para la intervención terapéutica.

30 Ciertos aspectos preferentes de la invención han sido desarrollados a partir del descubrimiento de que los anticuerpos contra los aminofosfolípidos, fosfatidilserina (PS) , se localizan específicamente en la vasculatura de tumores sólidos e, incluso de manera más sorprendente, ejercen un efecto de destrucción del tumor en ausencia de conjugación a moléculas efectivas, tales como toxinas o coagulantes. Por lo tanto, los elementos terapéuticos de componente único dirigidos contra los aminofosfolípidos representan un descubrimiento importante en el ataque vascular y proporcionan métodos seguros y eficaces para el tratamiento de los tumores sólidos.

40 Las utilidades de la invención proporcionan el exterminio, o exterminio específico, de células endoteliales vasculares, y comprenden la administración a un animal o un paciente que tiene un tumor vascularizado de como mínimo una dosis de una cantidad biológicamente efectiva de como mínimo un primer compuesto farmacéutico que comprende un anticuerpo desnudo o no conjugado, o una zona de unión de antígeno del mismo, que se une como mínimo a un primer aminofosfolípido expresado en la superficie luminal de las células endoteliales vasculares del tumor. La cantidad biológicamente efectiva es la cantidad del anticuerpo desnudo o no conjugado eficaz para exterminar específicamente como mínimo una parte, y preferentemente una parte significativa, de las células endoteliales vasculares del tumor, en oposición a células endoteliales de vasos normales, después de su unión a un aminofosfolípido expresado sobre la superficie luminal de las células endoteliales vasculares del tumor. Por lo tanto, se trata de una cantidad de exterminio de células de endotelio o una cantidad de exterminio de células de endotelio vasculares de un tumor de un anticuerpo anti-aminofosfolípido no conjugado o de una región de unión de antígeno de la misma.

45 Como se usa en toda la solicitud entera, los términos un y una se usan en el sentido que significan como mínimo uno o una, como mínimo una primera, uno o más o una pluralidad de los componentes mencionados, excepto en casos en donde se especifica explícitamente después de eso un límite superior. Por lo tanto, un anticuerpo anti-aminofosfolípido significa como mínimo un primer anticuerpo anti-aminofosfolípido. Los límites operativos y los parámetros de las combinaciones, como con las cantidades de un solo agente, serán conocidas para los técnicos con experiencia en el campo a la luz de la siguiente descripción.

50 Los términos un y una también se usan para significar como mínimo uno o una, como mínimo un primer o una primera, uno o mas o una pluralidad de etapas en los métodos mencionados, excepto cuando específicamente se

menciona. Esto es particularmente relevante a las etapas de administración en los métodos de tratamiento. Por lo tanto, no solamente se pueden emplear muchas dosis diferentes con la presente invención, sino diferentes números de dosis, por ejemplo, se pueden usar inyecciones, hasta incluir inyecciones múltiples.

5 Un aminofosfolípido, como se usa en la presente invención, significa un fosfolípido que incluye dentro de su estructura como mínimo un primer grupo amino primario. Preferiblemente, el término aminofosfolípido se usa para referirse a un fosfolípido que contiene un grupo amino primario que se presenta naturalmente en las membranas celulares de mamíferos. Sin embargo, ésta no es una limitación del significado del término aminofosfolípido, ya que el término también se extiende a aminofosfolípidos que se presentan de forma no natural o sintéticos que, sin embargo, tiene usos en la invención, por ejemplo, como un inmunógeno en la generación de anticuerpos anti-aminofosfolípidos (anticuerpos de reacción cruzada) que se enlazan a los aminofosfolípidos de las membranas del plasma de los mamíferos. Los aminofosfolípidos de la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.767.298 son ejemplos adecuados.

15 Los aminofosfolípidos prominentes encontrados en sistemas biológicos de mamíferos son los fosfatidilserina (PS) cargados negativamente y las fosfatidiletanolaminas (PE) zwitteriónicas o neutras, que por lo tanto son los aminofosfolípidos preferentes para ser usados como blancos o diana por la presente invención. Sin embargo, la invención de ninguna manera se limita a las fosfatidilserinas y a las fosfatidiletanolaminas como objetivos, y cualquier otro aminofosfolípido se puede emplear como objetivo (White y otros, 1978) en tanto esté expresado, sea accesible o esté complejo en la superficie luminal de las células endoteliales vasculares del tumor.

20 Todos los componentes basados en aminofosfolípidos, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina están incluidos como objetivos de la invención independientemente del tipo de cadenas de ácidos grasos involucrados, incluyendo aquellos con ácidos grasos de cadena corta, intermedia o larga, y aquellos ácidos grasos saturados, insaturados y poli-insaturados. Las composiciones preferentes para cultivar anticuerpos para su uso en la presente invención pueden ser aminofosfolípidos con ácidos grasos de 18 átomos de carbono, siendo C18:1 los más preferentes (Levy y otros, 1990) . El grado en que son accesibles sobre las células endoteliales vasculares de los tumores, los productos de la degradación de aminofosfolípidos que tienen solamente un ácido graso (derivados de liso) , en vez de dos, también se pueden usar como blancos (Qamar y otros, 1990) .

25 Otro grupo de objetivos de aminofosfolípidos potenciales incluyen, por ejemplo, derivados de fosfatidil (plasmalógenos) , tales como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (que tienen ya sea un enlace que da un grupo alqueno, en vez de un enlace éster que da un grupo acilo) . Sin duda, los objetivos para la intervención terapéutica mediante la presente invención incluyen cualquier aminofosfolípido que está presente, expresado, translocalizado, presentado o de otro modo formando complejo en una forma que puede ser dirigida sobre la superficie luminal de las células endoteliales vasculares del tumor. Los lípidos que no contienen glicerol también pueden formar objetivos adecuados, tales como los esfingolípidos basados en la esfingosina y sus derivados.

30 La base biológica para incluir una gama de lípidos en el grupo de componentes que pueden ser blancos, está, en parte, en el fenómeno biológico observado de los lípidos y proteínas que se combinan en ambientes membranosos para formar complejos únicos de lípidos-proteína. Estos complejos de lípido-proteína se extienden a formas antigénicas e inmunogénicas de lípidos tales como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina con, por ejemplo, proteínas tales como β_2 - glicoproteína I, protrombina, quinógenos y precalicreína.

35 Los métodos de la invención también actúan para detener el flujo sanguíneo, o específicamente detener el flujo sanguíneo en la vasculatura de los tumores. Esto se logra administrando a un animal o paciente que tiene un tumor vascularizado como mínimo una dosis de como mínimo una primera composición farmacéutica que comprende una cantidad que induce a la coagulación, o una cantidad que ocluye el vaso, de como mínimo un primer anticuerpo no conjugado o desnudo o una zona de enlace con el antígeno del mismo, que se enlaza con un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, translocalizada en la superficie luminal de la vasculatura del tumor.

40 La cantidad que induce a la coagulación o cantidad que ocluye los vasos es una cantidad del anticuerpo no conjugado o desnudo efectivo para inducir o promover específicamente la coagulación en como mínimo una porción, y por lo tanto ocluir la misma, y preferiblemente una porción significativa, de los vasos del tumor o vasos intratumorales, en oposición a los vasos sanguíneos normales, después de unirse a un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, translocalizada en la superficie luminal de los vasos sanguíneos del tumor. La cantidad que ocluye los vasos por lo tanto es una cantidad funcionalmente efectiva, y no es una masa física de anticuerpo suficiente para extender el alcance de un vaso.

45 Los métodos para destruir o específicamente destruir la vasculatura del tumor se dan a conocer comprendiendo administrar a un animal o paciente que tiene un tumor vascularizado una o más dosis de como mínimo una primera composición farmacéutica que comprende una cantidad destructora de tumor de como mínimo un primer anticuerpo no conjugado o desnudo, o una zona de enlace con antígeno del mismo, que se enlaza con un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, presentada sobre la superficie luminal de la vasculatura del tumor. La cantidad destructora de tumor es una cantidad del anticuerpo no conjugado o desnudo efectivo para destruir específicamente u ocluir como mínimo una porción, y preferiblemente una porción significativa, de vasos

sanguíneos del tumor en oposición a los vasos sanguíneos normales, después de enlazarse a un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, presentado sobre la superficie luminal de las células endoteliales vasculares de los vasos sanguíneos del tumor.

5 Se dan a conocer métodos para tratar cáncer y tumores sólidos, que comprenden la administración a un animal o paciente que tiene un tumor vascularizado de una cantidad o cantidades que inducen a la necrosis del tumor de como mínimo una primera composición farmacéutica que comprende como mínimo un primer anticuerpo no conjugado o desnudo, o un fragmento del mismo de enlace al antígeno, que se enlaza con un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, sobre la superficie luminal de vasos sanguíneos del tumor vascularizado. La cantidad que induce a la necrosis del tumor es una cantidad del anticuerpo no conjugado o
10 desnudo efectivo para inducir específicamente necrosis hemorrágica en como mínimo una porción, y preferiblemente una porción significativa, del tumor después de enlazarse a un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, formando complejo en la superficie luminal de las células endoteliales vasculares de los vasos sanguíneos del tumor, al mismo tiempo que ejerce pequeños efectos secundarios en los tejidos normales, saludables.

15 Los métodos dados a conocer en esta invención se pueden resumir, por lo tanto, como métodos para tratar a un animal o paciente que tiene un tumor vascularizado, que comprende administrar al animal o paciente como mínimo una primera dosis de una cantidad terapéuticamente efectiva de como mínimo una primera composición farmacéutica que comprende como mínimo un primer anticuerpo no conjugado o desnudo, o un fragmento del mismo de enlace a un antígeno, que se enlaza a un aminofosfolípido (preferiblemente fosfatidilserina o
20 fosfatidiletanolamina) presente, expresado, translocalizado, presentado o formando complejo en la superficie luminal de los vasos que transportan sangre del tumor vascularizado.

La esencia de la invención también se puede definir como una composición que comprende como mínimo un primer anticuerpo anti-aminofosfolípido desnudo o no conjugado, preferentemente un anticuerpo anti-fosfatidilserina o anti-fosfatidiletanolamina, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, a utilizar en la preparación de un
25 medicamento para su utilización en destrucción de los vasos de tumores y para tratamiento de tumores humanos. Esto puede ser definido también como un compuesto que comprende como mínimo un primer anticuerpo anti-aminofosfolípido desnudo o no conjugado, preferentemente anticuerpo anti-PS o anti-PE, o un fragmento del mismo de unión de antígeno, para su uso en la preparación de un medicamento para su uso en el enlace a un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, presente, expresado, translocalizado,
30 presentado o formando complejo en la superficie luminal de los vasos que transportan sangre de un tumor vascularizado y para su uso en inducir la destrucción de la vasculatura del tumor y para el tratamiento de tumor humano.

En los medicamentos y usos de la presente invención, una de las ventajas está en el hecho de que la disposición de un compuesto de anticuerpo anti-aminofosfolípido desnudo o no conjugado, preferentemente anti-fosfatidilserina o
35 anti-fosfatidiletanolamina, en la circulación sistémica de un animal o paciente tiene como resultado la destrucción preferente o específica de la vasculatura del tumor y la inducción de necrosis tumoral. La invención soluciona, por lo tanto, el problema de los métodos de preparación compleja de los agentes multicomponente anti-vasculares de la técnica anterior.

Los términos anticuerpo desnudo y no conjugado, tal como se utilizan en esta descripción, están destinados a hacer
40 referencia a un anticuerpo que no está conjugado, enlazado operativamente o asociado de otro modo física o funcionalmente con la fracción efectiva, tal como un agente citotóxico o coagulante. Se comprenderá que los términos desnudo y no conjugado para el anticuerpo no excluyen constructos de anticuerpos que han sido estabilizados, multimerizados, humanizados o manipulados de cualquier otra forma, por otros métodos que no son el acoplamiento de una fracción efectiva.

45 De acuerdo con lo anterior, se incluyen todos los anticuerpos desnudos y no conjugados modificados post-traslacionalmente, incluyendo el caso en el que las modificaciones están realizadas en un medio celular natural productor de anticuerpos, por células recombinantes productoras de anticuerpos, y se introducen por la acción del hombre después de una preparación de anticuerpo inicial. Desde luego, el término anticuerpo desnudo no excluye la capacidad del anticuerpo en formar asociaciones funcionales con células efectivas y/o moléculas después de
50 administración al cuerpo, y algunas de dichas interacciones son necesarias para ejercer un efecto biológico. La falta de grupo efector asociado se aplica, por lo tanto, en definición al anticuerpo desnudo *in vitro*, no *in vivo*.

En el contexto de la presente invención, el término un tumor vascularizado más preferiblemente significa un tumor maligno, vascularizado, tumor sólido, o cáncer. La invención es particularmente ventajosa para tratar tumores vascularizados de como mínimo aproximadamente tamaño intermedio, y para tratar tumores vascularizados grandes
55 - - aunque esto de ninguna manera es una limitación de la invención. La invención por lo tanto se puede usar en el tratamiento de cualquier tumor que muestre vasos sanguíneos positivos aminofosfolípidos, preferiblemente vasos sanguíneos positivos a fosfatidilserina y/o fosfatidiletanolamina.

En las realizaciones preferentes, los tumores que se van a tratar con la presente invención mostrarán un número efectivo de eliminación de vasos sanguíneos positivos al aminofosfolípido. Un número efectivo de eliminación de

vasos sanguíneos positivos a los aminofosfolípidos, como se usó en la presente descripción, significa que como mínimo aproximadamente 3 por ciento del número total de vasos sanguíneos dentro del tumor serán positivos a la expresión de aminofosfolípidos, preferiblemente la expresión de fosfatidilserina y/o fosfatidiletanolamina. Preferiblemente, como mínimo aproximadamente 5 por ciento, como mínimo aproximadamente 8 por ciento, o como mínimo aproximadamente 10 por ciento, o aproximadamente, del número total de vasos sanguíneos dentro del tumor serán positivos a la expresión de aminofosfolípido. Dada la naturaleza negativa a los aminofosfolípidos particularmente negativos a PS de los vasos sanguíneos dentro de los tejidos normales, los vasos del tumor actuarán como un sumidero para los anticuerpos administrados. Además, ya que la destrucción de solamente un número mínimo de vasos del tumor puede causar trombosis extendida, la necrosis y una avalancha de muerte celular de tumor, la localización de anticuerpos en la totalidad o en la mayoría de los vasos del tumor no es necesaria para la intervención terapéutica efectiva.

Sin embargo, en realizaciones más preferentes, los tumores que se van a tratar por esta invención mostrarán un número significativo de vasos sanguíneos positivos a aminofosfolípidos. Un número significativo de vasos sanguíneos positivos a los aminofosfolípidos, como se usa en la presente descripción, significa que como mínimo aproximadamente del 10 al 12 por ciento del número total de vasos sanguíneos dentro del tumor serán positivos para la expresión de aminofosfolípidos, preferiblemente fosfatidilserina y/o fosfatidiletanolamina. Aún más preferiblemente, el porcentaje de vasos de tumor que expresan aminofosfolípido será como mínimo de aproximadamente 15 por ciento, como mínimo 20 por ciento, como mínimo aproximadamente 30 por ciento, como mínimo aproximadamente 40 por ciento, como mínimo aproximadamente 50 por ciento, como mínimo aproximadamente 60 por ciento, como mínimo aproximadamente 70 por ciento, o como mínimo aproximadamente 80 por ciento del número total de vasos sanguíneos dentro del tumor, hasta e incluyendo como mínimo aproximadamente 90 por ciento o 95 por ciento de los vasos.

Las cantidades terapéuticamente efectivas para su uso en la invención son cantidades de anticuerpos anti-aminofosfolípidos no conjugados o desnudos, preferentemente anticuerpos anti-PS o anti-PE, efectivas para matar específicamente como mínimo una porción de las células endoteliales vasculares del tumor; para promover específicamente la coagulación en como mínimo una porción de los vasos sanguíneos tumorales; para ocluir específicamente o destruir como mínimo una porción de los vasos del tumor que transportan sangre; para específicamente inducir necrosis en como mínimo una porción de un tumor; y/o para inducir la regresión o remisión del tumor después de la administración a animales o pacientes seleccionados. Estos efectos se logran al mismo tiempo que muestran poco o ningún enlace, con poca o ninguna eliminación, de células endoteliales vasculares en tejidos saludables, normales; poca o ninguna coagulación en, oclusión o destrucción de vasos sanguíneos en tejidos normales, saludables; y ejercer efectos secundarios adversos manejables o despreciables sobre tejidos saludables, normales, del animal o paciente.

Los términos preferentemente y específicamente, como se usan en la presente descripción en el contexto de promover la coagulación en, o destruir, la vasculatura del tumor, y/o en el contexto de causar necrosis en el tumor, significan por tanto que los anticuerpos anti-aminofosfolípidos funcionan para lograr la coagulación, destrucción y/o necrosis del tumor que se confina sustancialmente a la vasculatura del tumor y el ciclo del tumor, y no se extiende sustancialmente al causar coagulación, destrucción y/o necrosis de tejido en tejidos saludables, normales, del animal o sujeto. La estructura y función de las células saludables y de los tejidos se mantiene sustancialmente sin daño por la práctica de la invención.

Las ventajas terapéuticas se pueden conseguir por la administración de un mínimo de dos, tres o más anticuerpos anti-aminofosfolípido desnudos o no conjugados; anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos; y/o diméricos, triméricos o multiméricos. Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos pueden ser combinados también con otras terapias para proporcionar cantidades terapéuticamente efectivas combinadas, tal como se da a conocer en esta descripción.

Si bien la comprensión del mecanismo de acción no es necesaria para la práctica de la presente invención de tratamiento por anticuerpo anti-aminofosfolípidos, los métodos pueden funcionar para inducir citotoxicidad mediada por células, lisis mediada de forma complementaria y/o apoptosis. Los métodos citotóxicos pueden ser también basados en señalización celular inducida por anticuerpos (señalización directa), o imitación o alteración de las rutas de transducción de señales (señalización indirecta). La capacidad de los anticuerpos anti-aminofosfolípidos para la localizar y unirse a un componente de la propia membrana puede ser también relevante, en oposición a otras terapias anteriores que están dirigidas en general a la unión a un componente de proteína o complejo de proteína, que puede ser estéricamente distinto o distante de la superficie de la membrana propiamente dicha.

Los métodos de tratamiento dados a conocer en esta invención incluyen, por tanto, administrar a un animal o paciente que tiene un tumor vascularizado como mínimo una primera composición farmacéutica que comprende una cantidad de como mínimo un primer constructo anticuerpo efectivo para inducir, o para inducir específicamente, citotoxicidad mediada por células de, como mínimo, una parte de las células endoteliales vasculares del tumor. En este caso, el primer constructo del anticuerpo es un anticuerpo desnudo o no conjugado, o fragmentos eficaces del mismo, que se unen a un aminofosfolípido, preferentemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, presente, expresada, translocada, presentada o en forma de complejo en la superficie luminal de las células endoteliales vasculares del tumor y que induce citotoxicidad mediada por las células de como mínimo una parte de las células endoteliales vasculares del tumor, en oposición a las células endoteliales en vasos normales. Como se usa en la

presente descripción, la citotoxicidad o destrucción mediada por células incluye eliminación celular ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y NK (eliminador natural) .

Los métodos dados a conocer además incluyen administrar a un animal o paciente que tiene un tumor vascularizado como mínimo una primera composición farmacéutica que contiene una cantidad de como mínimo una primera formación de anticuerpo efectiva para inducir, o específicamente inducir, la lisis mediada por complemento de como mínimo una porción de las células endoteliales vasculares del tumor. En la presente descripción, la primera formación de anticuerpo es un anticuerpo no conjugado o desnudo, o un fragmento efectivo del mismo, que se enlaza a un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina presente, expresada, translocalizada, presentada o formando complejo en la superficie luminal de las células endoteliales vasculares del tumor e induce la lisis mediada por complemento de como mínimo una porción de las células endoteliales vasculares del tumor, en oposición a las células endoteliales en vasos normales. Como se usa en la presente descripción, citotoxicidad o lisis dependiente del complemento o mediada por el complemento significa el proceso mediante el cual se activa la cascada de coagulación dependiente del complemento, se ensamblan complejos multicomponentes, generando finalmente un complejo lítico que tiene una acción lítica directa, causando la permeabilización de las células. Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos para su uso para inducir la lisis mediada por complemento generalmente incluirán una porción Fc del anticuerpo.

Los mecanismos basados en complemento mediante los cuales la presente invención puede operar además incluyen ADCC activada por complemento. En estos aspectos, los anticuerpos no conjugados o desnudos administrados, o fragmentos del mismo, se enlazan con un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, presentes, expresados, translocalizados, presentados o formando complejo en la superficie luminal de las células endoteliales vasculares del tumor e inducen ADCC activada por complemento de como mínimo una porción de las células endoteliales vasculares del tumor, en oposición a las células endoteliales en vasos normales. ADCC activada por complemento se usa para referirse al proceso mediante el cual el complemento, no una porción Fc de anticuerpo en sí, retiene un complejo de componentes múltiples juntos y en el cual las células tales como los neutrófilos provocan lisis en la célula objetivo.

En otras realizaciones, los métodos dados a conocer incluyen administrar a un animal o paciente que tiene un tumor vascularizado como mínimo una primera composición farmacéutica que contiene una cantidad de como mínimo una primera formación de anticuerpo efectivo para inducir, o específicamente inducir, apoptosis en como mínimo una porción de las células endoteliales vasculares del tumor. En la presente descripción, la primera formación de anticuerpo es un anticuerpo no conjugado o desnudo, o un fragmento de enlace a antígeno del mismo, que se enlaza a un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, presente, expresado, translocalizado, presentado o formando complejo en la superficie luminal de las células endoteliales vasculares del tumor y que induce apoptosis en como mínimo una porción de las células endoteliales vasculares del tumor, en oposición a las células endoteliales en vasos normales. Como se usa en la presente descripción, induce apoptosis significa que induce el proceso de la muerte celular programada que, durante las etapas iniciales, mantiene la integridad de la membrana celular y luego transmite las señales que inducen la muerte en la célula. Esto se opone al mecanismo de necrosis celular durante la cual la membrana celular pierde su integridad y se vuelve frágil al surgir el proceso.

Los métodos de tratamiento de anticuerpos anti-aminofosfolípidos comportarán de manera general la administración, como mínimo, de una dosis de un compuesto farmacéuticamente efectivo al animal de forma sistémica, por ejemplo, por inyección intravenosa. No obstante, cualquier ruta de administración que permita que el anticuerpo localice las células endoteliales vasculares del tumor y que induzca citotoxicidad mediada por células, lisis mediada de forma complementaria y apoptosis será aceptable.

Administración, como se usa en la presente descripción, significa por lo tanto la disposición o entrega de anticuerpos anti-aminofosfolípidos en una cantidad o cantidades durante un período de tiempo efectivo para permitir el enlace con un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, presente, expresado, translocalizado, presentado o formando complejo en la superficie luminal de los vasos de transporte de sangre del tumor vascularizado y ejercer un efecto destructivo de la vasculatura del tumor y regresivo del tumor. Generalmente se prefiere la administración pasiva de los anticuerpos proteináceos, en parte, por su simplicidad y reproducibilidad.

Sin embargo, el término administración se usa en la presente descripción para referirse a cualquier y todo medio mediante el cual los anticuerpos anti-aminofosfolípidos se administran o de otro modo se proporcionan a la vasculatura del tumor. Administración por lo tanto incluye la disposición de células, tales como hibridomas, que producen los anticuerpos anti-aminofosfolípidos de una manera efectiva para dar como resultado la administración de los anticuerpos anti-aminofosfolípidos a la vasculatura del tumor y/o su localización a esta vasculatura. En estas realizaciones, puede ser deseable formular o agrupar las células productoras de anticuerpos en una membrana selectivamente permeable, estructura o dispositivo implantable, generalmente uno que se pueda eliminar para cesar la terapia.

Los términos administración de anticuerpos, tal como se utiliza en esta descripción, se extiende también a todos los métodos por los cuales se generan en un paciente anticuerpos anti-aminofosfolípido (anticuerpos endógenos) , que les permiten circular y localizarse en la vasculatura del tumor. Por lo tanto, la administración incluye también la

inmunización activa de un paciente con una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de un aminofosfolípido, antígeno o inmunógeno. Todos los métodos de inmunización humana son apropiados para su utilización en estas realizaciones, poniendo, por ejemplo, los que se describen a continuación en el contexto de la generación de una respuesta de anticuerpo anti-aminofosfolípido en un animal a efectos de obtener el anticuerpo del mismo. La administración de anticuerpos exógenos será preferente en general con respecto al suministro basado en células y en inmunización, dado que esto representa un método menos invasivo que permite la supervisión y control íntimos de la dosis.

Los métodos de administración de anticuerpos también se extienden a la disposición de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-aminofosfolípidos de una manera efectiva para dar como resultado la expresión de los anticuerpos anti-aminofosfolípidos en la vecindad de la vasculatura del tumor, y/o en la expresión de los anticuerpos anti-aminofosfolípidos que pueden localizarse en la vasculatura del tumor. Cualquier técnica de terapia de genes se puede emplear, tales como administración de ADN natural, genes y vectores recombinantes, administración basada en células, incluyendo manipulación *ex vivo* de las células del paciente, y similares.

Uno de los beneficios de la presente invención es que los aminofosfolípidos, preferiblemente la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina, generalmente se expresan o están disponibles en todos los vasos del tumor. La expresión de aminofosfolípidos en vasos sanguíneos intratumorales, establecidos, es ventajosa para conseguir el blanco y destruir estos vasos ya que rápidamente se conducen los efectos antitumor. Sin embargo, en tanto los anticuerpos anti-aminofosfolípidos administrados se enlacen a como mínimo una porción de los vasos de transporte de sangre, los efectos antitumor significativos serán el resultado. Esto no será problemático, ya que los aminofosfolípidos, tales como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, se expresan en vasos centrales, grandes, y también en venas, vénulas, arterias, arteriolas y capilares que transportan sangre en todas las regiones del tumor.

En cualquier caso, la capacidad de los anticuerpos anti-aminofosfolípidos para destruir la vasculatura del tumor significa que se puede lograr la regresión del tumor, en vez de solamente la estasis del tumor. La estasis del tumor frecuentemente es el resultado de terapias anti-angiogénicas que solamente dan en el blanco en los vasos sobresalientes en la periferia de un tumor sólido y detienen la proliferación de los vasos. Aún si la presente invención ataca a más de las regiones periféricas del tumor en ciertos tipos de tumor, lo que no se cree actualmente que sea el caso, la destrucción de los vasos de transporte de sangre en estas áreas todavía conduciría a trombosis amplia y necrosis del tumor.

En cualquiera de los métodos anteriores, los términos anticuerpo anti-aminofosfolípido, anticuerpo desnudo y anticuerpo no conjugado, como se usan en la presente descripción, se refieren ampliamente a cualquier agente de enlace inmunológico, tal como anticuerpos IgG, IgM, IgA, IgD e IgE policlonales y monoclonales. Generalmente, se prefieren IgG y/o IgM debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y debido a que se hacen más fácilmente en un escenario de laboratorio.

Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos policlonales, obtenidos a través de antisuero, se pueden emplear en la invención. Sin embargo, el uso de anticuerpos anti-aminofosfolípidos monoclonales (MAbs) se preferirá generalmente. Los MAbs se reconoce que tienen ciertas ventajas, por ejemplo, reproducibilidad y producción a gran escala, que los hace adecuados para el tratamiento clínico. La invención proporciona, por lo tanto, anticuerpos monoclonales de origen murino, humano, de mono, rata, hámster, conejo y hasta de sapo o pollo. Debido a la facilidad de preparación y rápida disponibilidad de reactivos, los anticuerpos monoclonales murinos se usarán en ciertas realizaciones.

Como se entenderá por los expertos en la técnica, los reactivos de enlace inmunológico abarcados por el término anticuerpo anti-aminofosfolípidos se extienden a todos los anticuerpos anti-aminofosfolípidos desnudos y no conjugados de todas las especies, y fragmentos de enlace de antígenos de los mismos, incluyendo anticuerpos diméricos, triméricos y multiméricos; anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos; anticuerpos humanos y humanizados; anticuerpos recombinantes y diseñados técnicamente, y fragmentos de los mismos.

El término anticuerpo anti-aminofosfolípido se usa entonces para referirse a cualquier molécula parecida a anticuerpo anti-aminofosfolípido que tiene una región de enlace de antígeno, e incluye fragmentos de anticuerpos tales como Fab', Fab, F (ab')₂, anticuerpos de dominio simple (DABs), Fv, scFv (Fv de cadena simple) y similares. Las técnicas para preparar y usar varias formaciones y fragmentos basados en anticuerpos son muy conocidas en la técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos empleados serán anticuerpos humanos o humanizados. Los anticuerpos humanizados generalmente son anticuerpos monoclonales quiméricos de ratón, rata, u otras especies no humanas, que tienen dominios de regiones constantes y/o variables humanas (anticuerpos quiméricos en parte-humanos). En gran medida, los anticuerpos monoclonales humanizados para su uso en la presente invención serán anticuerpos quiméricos en donde como mínimo una primera región de enlace de antígeno, o región de determinación de complementariedad (CDR), de un ratón, rata u otro anticuerpo monoclonal anti-aminofosfolípido no humano se une operativamente o se injerta a una región constante de anticuerpo humano o estructura.

Los anticuerpos monoclonales humanizados para su uso en la presente descripción también pueden ser anticuerpos monoclonales anti-aminofosfolípido a partir de especies no humanas en donde uno o más aminoácidos seleccionados se han intercambiado por aminoácidos más comúnmente observados en anticuerpos humanos. Esto se puede lograr fácilmente a través del uso de tecnología recombinante de rutina, particularmente mutagénesis específica al sitio.

Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos completamente humanos, en vez de humanizados, también se pueden preparar y usar en la presente invención. Estos anticuerpos humanos pueden ser anticuerpos policlonales, obtenidos por pacientes humanos que tienen una o más de una variedad de enfermedades, desórdenes o condiciones clínicas asociadas con la producción de anticuerpos anti-aminofosfolípidos. Estos anticuerpos se pueden concentrar, parcialmente purificar o sustancialmente purificar para su uso en la presente descripción.

También está disponible una gama de técnicas para preparar anticuerpos monoclonales humanos. Como existen pacientes humanos con enfermedades que producen anticuerpos anti-aminofosfolípidos, las células que producen anticuerpos de anti-aminofosfolípidos de estos pacientes se pueden obtener y manipular *in vitro* para proporcionar un anticuerpo monoclonal humano. Las manipulaciones o técnicas *in vitro* incluyen fusión para preparar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal y/o la clonación del gen o genes que codifican el anticuerpo anti-aminofosfolípido a partir de las células (anticuerpos recombinantes humanos).

Las células humanas que producen anticuerpos anti-aminofosfolípidos también se pueden obtener a partir de sujetos humanos sin una enfermedad asociada con anticuerpos anti-aminofosfolípidos, es decir, sujetos sanos en el contexto de la presente invención". Para lograr esto, simplemente se debería obtener una población de linfocitos de sangre periférica mezclada de un sujeto humano, incluyendo células que presentan antígeno y producen anticuerpos, y estimular la población de células *in vitro* mezclando con una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido. Nuevamente, las células que producen anticuerpos anti-aminofosfolípidos humanas, en cuanto se obtienen, podrían usarse en la producción de hibridomas y/o anticuerpos recombinantes.

Otras técnicas para la producción de anticuerpo monoclonal humano incluyen inmunizar un animal transgénico, preferiblemente un ratón transgénico, que comprende una biblioteca de anticuerpo humano con una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido. Esto también genera células humanas que producen anticuerpo anti-aminofosfolípido para su posterior manipulación en producción de hibridoma y/o anticuerpo recombinante, con la ventaja de que las células del bazo, en vez de las células de la sangre periférica, se pueden obtener fácilmente del animal transgénico o ratón transgénico.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término anticuerpo anti-aminofosfolípido se utiliza de manera coextensiva con desnudo y no conjugado con el significado de anticuerpos anti-aminofosfolípido, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que no están conjugados o asociados operativamente con moléculas efectivas, tales como un agente citotóxico o un coagulante. Además de las modificaciones no efectivas del anticuerpo, y de las interacciones *in vivo*, el término desnudo no excluye en modo alguno combinaciones del anticuerpo con otros agentes terapéuticos, tal como se da a conocer de manera detallada.

Como contraste, los anticuerpos anti-aminofosfolípidos, anticuerpos biespecíficos, y fragmentos de unión de antígenos de los mismos, que están conjugados a agentes citotóxicos o anticelulares o asociados operativamente con los mismos, se designan en esta descripción inmunotoxinas anti-aminofosfolípidos. De manera similar, los anticuerpos anti-aminofosfolípidos, anticuerpos biespecíficos, y fragmentos de unión con antígenos de los mismos, que están conjugados o asociados operativamente con factores de coagulación, se indican en esta descripción como coaguligandos anti-aminofosfolípidos. La utilización de inmunotoxinas anti-aminofosfolípidos y coaguligandos anti-aminofosfolípidos en el tratamiento de tumores se prevé también por los presentes inventores y se da a conocer en la solicitud PCT número WO-A-00/02587.

Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos preferentes para su uso en la presente invención son anticuerpos anti-fosfatidilserina (anti-PS) y anti-fosfatidiletanolamina (anti-PE). Los anticuerpos anti-PS generalmente reconocerán, se enlazarán, o tendrán inmunoespecificidad para la molécula PS presente, expresada, translocalizada, presentada o formando complejo en la superficie luminal de las células endoteliales vasculares del tumor. Los anticuerpos adecuados se ligarán entonces a fosfatidil-L-serina (Umeda y otros, 1989). Los anticuerpos anti-PE generalmente reconocerán, se enlazarán a o tendrán inmunoespecificidad para la molécula PE presente, expresada, translocalizada, presentada o formando complejo en la superficie luminal de las células endoteliales vasculares del tumor.

La administración de anticuerpos anti-aminofosfolípidos a un animal con un tumor dará como resultado el enlace específico del anticuerpo a las moléculas de aminofosfolípido presentes, expresadas o translocalizadas en la superficie luminal de los vasos sanguíneos del tumor, es decir, los anticuerpos se enlazarán a las moléculas de aminofosfolípidos en un ambiente biológico, natural. Por lo tanto, no será necesaria ninguna manipulación particular para asegurar el enlace de anticuerpos.

Sin embargo, es de interés científico indicar que los aminofosfolípidos pueden ser más posiblemente reconocidos o enlazados, por anticuerpos anti-aminofosfolípidos cuando las moléculas de aminofosfolípidos se asocian con una o

más proteínas u otros componentes biológicos que no sean lípidos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PS que se presentan como un subconjunto de anticuerpos anti-fosfolípido (anti-PL) en pacientes con ciertas enfermedades y desórdenes se cree en este momento que se enlazan a PS en combinación con proteínas tales como β_2 -glicoproteína I (β_2 - GPI o apolipoproteína H, apoH) y protrombina (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.344.758; Rote, 1996; incorporadas a la presente invención como referencia) . De manera similar, los anticuerpos anti-PE que se presentan en estados de enfermedad en este momento se cree que se enlazan a PE en combinación con proteínas tales como quinínogeno de alto y bajo peso molecular (HK) , precalicreína y hasta un factor XI (Sugi y McIntyre, 1995; 1996a; 1996b) .

Éste es el significado de los términos presentados y formando complejo en la superficie luminal de los vasos sanguíneos del tumor, como se usa en la presente descripción, lo cual significa que las moléculas de aminofosfolípido están presentes en la superficie de los vasos sanguíneos del tumor en un estado competente de enlace de anticuerpo, independientemente de la definición molecular de ese estado particular. PS se puede aún usar de blanco como un complejo con factor II/IIa, VII/VIIa, IX/IXa y X/Xa. Más aún, la naturaleza del objetivo aminofosfolípido puede cambiar durante la práctica de la invención, ya que los efectos de enlace de anticuerpo de aminofosfolípido inicial, célula anti-endotelial y antitumor pueden dar como resultado cambios biológicos que alteran el número, la conformación y/o el tipo de objetivo aminofosfolípido epítipo (s) .

El término anticuerpo anti-aminofosfolípido, como se usa en el contexto de la presente invención, significa por lo tanto cualquier anticuerpo anti-aminofosfolípido no conjugado o desnudo, agente o antisuero de enlace inmunológico; anticuerpo monoclonal, humano, humanizado, dimérico, trimérico, multimérico, quimérico, biespecífico, recombinante o diseñado técnicamente; o Fab', Fab, F (ab')₂, DABs, Fv o fragmento de enlace de antígeno scFv de los mismos; que como mínimo se enlaza a un lípido y a un complejo que contiene un grupo amino o un objetivo aminofosfolípido, preferiblemente un objetivo basado en fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina.

El requisito de que el anticuerpo como mínimo se enlace a un objetivo aminofosfolípido se satisface por el anticuerpo que se enlaza a alguno y/o todas la formas fisiológicamente relevantes de los aminofosfolípidos, incluyendo el llamado PS y PE hexagonal y hexagonal fase II (HexII PS y HexII PE) (Rauch y otros, 1986; Rauch y Janoff, 1990; Berard y otros, 1993) y PS y PE en combinación con cualquier otra proteína, lípido, componente de membrana, plasma, o componente de suero, o cualquier combinación de los mismos. Por lo tanto, un anticuerpo anti-aminofosfolípido es un anticuerpo que se enlaza a un aminofosfolípido en los vasos sanguíneos del tumor, sin importar el hecho de que la bicapa o micela de aminofosfolípidos se pueden considerar inmunogénicamente neutros.

Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos pueden reconocer, enlazarse o tener inmunoespecificidad para moléculas aminofosfolípidas, o un complejo inmunogénico de las mismas (incluyendo aminofosfolípidos hexagonales y combinaciones de proteínas) , para la exclusión de otros fosfolípidos o lípidos. Estos anticuerpos se pueden denominar anticuerpos específicos de aminofosfolípidos o restringidos de aminofosfolípidos, y su uso en la invención frecuentemente será preferente. Los anticuerpos específicos para aminofosfolípidos o restringidos a los aminofosfolípidos generalmente mostrarán un enlace significativo a los aminofosfolípidos, al mismo tiempo que muestran poco o ningún enlace significativo con otros componentes lípidos, tales como fosfatidilinositol (PI) , fosfatidilglicerol (PG) y hasta fosfatidilcolina (PC) en ciertas realizaciones.

Los anticuerpos específicos para PS o restringidos a PS generalmente mostrarán enlaces significativos a PS, al mismo tiempo que muestran poco o ningún enlace significativo a los componentes lípidos tales como la fosfatidiletanolamina y la cardiolipina (CL) , así como PC, PI y PG. Los anticuerpos específicos para PE o restringidos a PE generalmente muestran enlace significativo a PE, al mismo tiempo que muestran poco o ningún enlace significativo a los componentes lípidos tales como la fosfatidilserina, la cardiolipina, así como a PC, PI y PG. La preparación de anticuerpos específicos anti-aminofosfolípidos se logra fácilmente, por ejemplo, como se describe por Rauch y otros, (1986) ; Umeda y otros, (1989) ; Rauch y Janoff (1990) ; y Rote y otros, (1993) .

Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos de reacción cruzada que reconocen, se enlazan o tienen inmunoespecificidad para una molécula de aminofosfolípido, o un complejo inmunogénico de la misma (incluyendo aminofosfolípidos hexagonales y combinaciones de proteínas) , además de mostrar un menor enlace pero detectable a otros fosfolípidos o componentes lípidos de ninguna manera se excluyen de su uso en la invención. Estos anticuerpos anti-aminofosfolípidos de reacción cruzada se pueden emplear en tanto se enlacen con un aminofosfolípido presente, expresado, translocalizado, presentado o formando complejo en la superficie luminal de las células endoteliales vasculares del tumor y ejercen un efecto antitumor en la administración *in vivo*.

Otros anticuerpos adecuados específicos de aminofosfolípidos o restringidos a los aminofosfolípidos son aquellos anticuerpos anti-aminofosfolípidos que se enlazan tanto a PS como a PE. Aunque claramente son específicos o restringidos a los aminofosfolípidos, en oposición a otros componentes lípidos, existen anticuerpos que se enlazan a cada uno de los objetivos preferentes de la presente invención. Ejemplos de esos anticuerpos para su uso en la invención incluyen, pero sin limitación, PS3A, PSF6, PSF7, PSB4, PS3H1 y PS3E10 (Igarashi y otros, 1991) .

Otros anticuerpos anti-PS para su uso a título de ejemplo en la invención incluyen, pero sin limitación, BA3B5C4, PS4A7, PS1G3 y 3SB9b; siendo los preferentes PS4A7, PS1G3 y 3SB9b. Los anticuerpos monoclonales, los

anticuerpos humanizados y/o los fragmentos de enlace de antígenos basados en el anticuerpo 3SB9b (Rote y otros, 1993) actualmente son los más preferentes.

Aunque los aminofosfolípidos, tales como PS y PE, en forma de bicapa o de micela se ha indicado que no son antigénicos o son débilmente antigénicos, o no son inmunogénicos o débilmente inmunogénicos, la literatura científica ha dado a conocer que no hay dificultad en generar anticuerpos anti-aminofosfolípidos, tales como anti-PS y anti-PE. Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos o anticuerpos monoclonales se pueden preparar fácilmente mediante procesos preparativos y métodos que comprenden:

(a) preparar una célula que produce anticuerpo anti-aminofosfolípido; y

(b) obtener un anticuerpo anti-aminofosfolípido o anticuerpo monoclonal a partir de la célula que produce el anticuerpo.

Los procesos para preparar células que producen anticuerpos anti-aminofosfolípidos y que obtienen anticuerpos anti-aminofosfolípidos de los mismos se pueden conducir en el sitio en un paciente dado. Esto es, simplemente proporcionando un cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido inmunogénico a un paciente, dará como resultado una generación de anticuerpo anti-aminofosfolípido. Por lo tanto, el anticuerpo anti-aminofosfolípido se obtiene de la célula que produce el anticuerpo, pero no tiene que ser aislado de una célula huésped y posteriormente proporcionarse a un paciente, siendo capaz de localizar espontáneamente la vasculatura del tumor y ejercer sus efectos antitumor biológicos.

Como se describe en la presente descripción, las células que producen anticuerpo anti-aminofosfolípido se pueden obtener, y los anticuerpos posteriormente aislados y/o purificados, a partir de paciente humanos con enfermedades que producen anticuerpos anti-aminofosfolípidos, a partir de estimular los linfocitos de la sangre periférica con aminofosfolípidos *in vitro*, y también mediante procesos y métodos de inmunización. Los últimos de los cuales generalmente comprenden:

(a) inmunizar un animal administrando al mismo como mínimo una dosis, y opcionalmente más de una dosis, de una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido inmunogénico (tal como una forma hexagonal, o hexagonal fase II de un aminofosfolípido), preferiblemente una muestra de PS o PE inmunogénico; y

(b) obtener una célula que produce anticuerpo anti-aminofosfolípido a partir del animal inmunizado.

La cantidad inmunogénicamente efectiva de la muestra o muestras de aminofosfolípido puede ser una muestra de aminofosfolípido recubierta con *Salmonella* (Umeda y otros, 1989; incorporada a la presente invención como referencia); una micela, liposoma, complejo lípido o muestra de formulación de lípido, aminofosfolípidos; o una muestra de aminofosfolípido fabricada con SDS. Cualquiera de estas muestras de aminofosfolípido se puede administrar en combinación con cualquier adyuvante adecuado, tal como el adyuvante completo de Freund (Rote y otros, 1993). Cualquier técnica o variación empírica se puede emplear para aumentar la inmunogenicidad, y/o las formas hexagonal o hexagonal fase II de los aminofosfolípidos se pueden administrar.

La inmunización se puede basar en una o más inyecciones intraesplénicas de una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra aminofosfolípida (Umeda y otros, 1989).

Independientemente de la naturaleza del proceso de inmunización, o del tipo de animal inmunizado, las células que producen anticuerpo anti-aminofosfolípido se obtienen a partir del animal inmunizado y, preferiblemente, se manipulan además por la mano del hombre. Un animal inmunizado, como se usa en la presente descripción, es un animal no humano, a menos que se diga expresamente lo contrario. Aunque se puede usar cualquier célula que produce anticuerpos, más preferiblemente se obtienen células del bazo como la fuente de células que producen anticuerpos. Las células que producen anticuerpos anti-aminofosfolípidos se pueden usar en un proceso preparativo que comprende:

(a) fusionar una célula que produce anticuerpos anti-aminofosfolípidos con una célula inmortal para preparar un hibridoma que produzca un anticuerpo anti-aminofosfolípido monoclonal y

(b) obtener un anticuerpo anti-aminofosfolípido monoclonal a partir de hibridoma.

Los métodos preparativos de anticuerpos monoclonales basados en hibridoma incluyen, por lo tanto, aquellos que comprenden:

(a) inmunizar un animal administrando al mismo como mínimo una dosis, y opcionalmente más de una dosis, de una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido inmunogénico (tal como una forma hexagonal, o hexagonal fase II de un aminofosfolípido), preferiblemente una muestra de PS o PE inmunogénica;

(b) preparar un conjunto de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales a partir del animal inmunizado;

(c) seleccionar del conjunto como mínimo un primer hibridoma que produzca como mínimo un primer anticuerpo monoclonal anti-aminofosfolípido, y preferiblemente como mínimo un primer anticuerpo monoclonal aminofosfolípido específico; y

5 (d) cultivar como mínimo un primer hibridoma que produce anti-aminofosfolípido o aminofosfolípido específico para proporcionar como mínimo un primer anticuerpo monoclonal anti-aminofosfolípido o anticuerpo monoclonal específico para aminofosfolípido; y preferiblemente

(e) obtener como mínimo un primer anticuerpo monoclonal anti-aminofosfolípido o anticuerpo monoclonal específico para aminofosfolípido a partir del cultivo de como mínimo un primer hibridoma.

10 Al utilizar animales no humanos para la inmunización, los anticuerpos monoclonales anti-aminofosfolípidos obtenidos de este hibridoma frecuentemente tendrán una conformación no humana. Estos anticuerpos se pueden someter opcionalmente a un proceso de humanización, injerto o mutación, como es conocido por los expertos en la técnica y se describe adicionalmente en la presente descripción. De manera alternativa, los animales transgénicos, tales como ratones, se pueden usar comprendiendo una biblioteca de genes de anticuerpos humanos. La inmunización de estos animales por lo tanto dará como resultado directamente la generación de anticuerpos anti-aminofosfolípidos humanos.

15 Después de la producción de una célula que produce anticuerpo adecuado, más preferiblemente un hibridoma, ya sea produciendo anticuerpos humanos o no humanos, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo monoclonal se pueden clonar para preparar un anticuerpo monoclonal recombinante. Se puede utilizar cualquier técnica de clonación recombinante, incluyendo el uso de PCR para iniciar la síntesis de las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos. Por lo tanto, métodos todavía más apropiados para preparar anticuerpos monoclonales incluyen aquellos que comprenden usar la célula que produce anticuerpo anti-aminofosfolípido como sigue:

(a) obtener como mínimo una primera molécula de ácido nucleico o segmento que codifica anticuerpo anti-aminofosfolípido a partir de una célula que produce anticuerpo anti-aminofosfolípido, preferiblemente un hibridoma; y

25 (b) expresar la molécula de ácido nucleico o el segmento en una célula huésped recombinante para obtener un anticuerpo monoclonal anti-aminofosfolípido recombinante.

Sin embargo, otras técnicas recombinantes poderosas están disponibles idealmente adaptadas a la preparación de anticuerpos monoclonales recombinantes. Estas técnicas recombinantes incluyen los métodos preparativos de anticuerpos monoclonales basados en biblioteca de fagémido que comprenden:

30 (a) inmunizar un animal administrando al mismo como mínimo una dosis, y opcionalmente más de una dosis, de una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido inmunogénico (tal como una forma hexagonal o hexagonal fase II de un aminofosfolípido) , preferiblemente una muestra de PS o PE inmunogénico;

(b) preparar una biblioteca de fagémido de inmunoglobulina combinatoria que expresa ARN aislado a partir de células que producen anticuerpos, preferiblemente del bazo, del animal inmunizado;

35 (c) seleccionar de la biblioteca del fagémido como mínimo un primer clon que expresa como mínimo un primer anticuerpo anti-aminofosfolípido, y preferiblemente, como mínimo un primer anticuerpo específico para aminofosfolípido;

(d) obtener ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-aminofosfolípidos a partir de como mínimo un primer clon seleccionado y expresar los ácidos nucleicos en una célula huésped recombinante para proporcionar como mínimo un primer anticuerpo anti-aminofosfolípido o anticuerpo específico aminofosfolípido; y preferiblemente

40 (e) obtener como mínimo un primer anticuerpo anti-aminofosfolípido o anticuerpo específico para aminofosfolípido expresado por los ácidos nucleicos obtenidos a partir de como mínimo un primer clon seleccionado.

Nuevamente, en estas técnicas basadas en biblioteca de fagémidos, se pueden emplear animales transgénicos que llevan bibliotecas de genes de anticuerpos humanos produciendo, por lo tanto, anticuerpos monoclonales humanos recombinantes.

45 Independientemente de la manera de preparación de un primer segmento de ácido nucleico de anticuerpo anti-aminofosfolípido, otros segmentos de ácido nucleico de anticuerpo anti-aminofosfolípido adecuados se pueden preparar fácilmente mediante técnicas de biología molecular estándares. Con el fin de confirmar que cualquier segmento de ácido nucleico de anticuerpo anti-aminofosfolípido variante, mutante o de segunda generación, es adecuado para su uso en la presente invención, el segmento de ácido nucleico se probará para confirmar la expresión de un anticuerpo que se enlaza a un aminofosfolípido. Preferiblemente, el segmento de ácido nucleico de anticuerpo anti-aminofosfolípido variante, mutante o de segunda generación, también se probará para confirmar la hibridización a un segmento de ácido nucleico de anticuerpo anti-aminofosfolípido bajo condiciones estándares, más preferiblemente, condiciones de hibridización estándares estrictas. Las condiciones de hibridización adecuadas, a título de ejemplo, incluyen la hibridización en aproximadamente 7 por ciento de dodecil sulfato de sodio (SDS) ,

aproximadamente 0,5 M NaPO₄, aproximadamente de 1 mM EDTA a aproximadamente 50°C; y lavado con aproximadamente 1 por ciento de SDS a aproximadamente 42°C.

Dado que una variedad de anticuerpos monoclonales recombinantes, ya sean humanos o no humanos en origen, se pueden preparar fácilmente, los métodos de tratamiento de la invención se pueden ejecutar proporcionando al animal o paciente como mínimo un primer segmento de ácido nucleico que expresa una cantidad biológicamente efectiva de como mínimo un primer anticuerpo anti-aminofosfolípido en el paciente. El segmento de ácido nucleico que expresa un anticuerpo anti-aminofosfolípido generalmente estará en forma de como mínimo una formación de expresión, y puede estar en forma de una formación de expresión que comprende un virus o dentro de una célula huésped recombinante. Preferiblemente los vectores de terapia de genes de la presente invención generalmente serán vectores virales, tales como comprendidos dentro de retrovirus recombinantes, virus de herpes simple (HSV), adenovirus, virus adenoasociados (AAV), citomegalovirus (CMV), y similares.

En ciertas realizaciones, primero tiene que formarse una imagen de la vasculatura del tumor vascularizado del animal o paciente que se va a tratar. Generalmente esto se logra administrando al animal o al paciente una cantidad diagnósticamente efectiva de como mínimo una primera composición farmacéutica que comprende como mínimo una primera formación de enlace aminofosfolípido etiquetada detectablemente, tal como una formación de agente anticuerpo-aminofosfolípido detectable, que se enlaza e identifica con un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, presente, expresado, translocalizado, presentado o formando complejo en la superficie luminal de los vasos sanguíneos del tumor vascularizado. Por lo tanto, la invención proporciona además composiciones para su uso en, y métodos de, distinguir entre los vasos sanguíneos de tumor y/o intratumorales y los vasos sanguíneos normales. La distinción se logra administrando una o más de las formaciones de enlace de aminofosfolípidos etiquetados detectablemente descritas.

La formación de enlace de aminofosfolípidos etiquetados detectablemente o la formación de agente anticuerpo anti-aminofosfolípido detectable puede comprender un compuesto detectable por rayos X, tal como bismuto (III), oro (III), lantano (III) o plomo (II); un ion radioactivo, tal como cobre⁶⁷, galio⁶⁷, galio⁶⁸, indio¹¹¹, indio¹¹³, yodo¹²³, yodo¹²⁵, yodo¹³¹, mercurio¹⁹⁷, mercurio²⁰³, renio¹⁸⁶, renio¹⁸⁸, rubidio⁹⁷, rubidio¹⁰³, tecnecio^{99m} o itrio⁹⁰; un isótopo de resonancia de giro magnética nuclear, tal como cobalto (II), cobre (II), cromo (III), disprosio (III), erbio (III), gadolinio (III), holmio (III), hierro (II), hierro (III), manganeso (II); neodimio (III), níquel (II), samario (III), terbio (III), vanadio (II) o iterbio (III); o rodamina o fluoresceína.

La formación previa de imagen antes del tratamiento del tumor se puede llevar a cabo, por lo tanto, mediante:

(a) administrar al animal o paciente una cantidad diagnósticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende como mínimo una primera formación de enlace de aminofosfolípido etiquetada detectablemente que comprende un agente de diagnóstico operativamente unido a un anticuerpo, proteína de enlace o ligando, o un fragmento de enlace de aminofosfolípido de los mismos, que se enlaza a un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, presente, expresado, translocalizado, presentado o formando complejo en la superficie luminal de los vasos sanguíneos o los vasos sanguíneos intratumorales del tumor vascularizado; y

(b) detectar posteriormente la formación de enlace de aminofosfolípido etiquetada detectablemente unida a un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, en la superficie luminal del tumor o vasos sanguíneos intratumorales, mediante lo cual se obtiene una imagen de la vasculatura del tumor.

El tratamiento para el cáncer también se puede llevar a cabo mediante:

a) formar una imagen de un tumor vascularizado administrando a un animal o paciente que tiene un tumor vascularizado una cantidad mínima diagnósticamente de como mínimo una primera formación de enlace de aminofosfolípido etiquetada detectablemente que comprende un agente de diagnóstico operativamente unido a un anticuerpo, enlazar la proteína o ligando, o el fragmento de enlace de aminofosfolípido de los mismos, que se enlaza con un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, en la superficie luminal del tumor o los vasos sanguíneos intratumorales del tumor vascularizado, formando mediante esto una imagen detectable de la vasculatura del tumor; y

(b) administrar posteriormente al mismo animal o paciente una cantidad terapéuticamente optimizada de como mínimo un primer anticuerpo desnudo, o un fragmento de enlace a antígeno del mismo, que se enlaza con un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, en la superficie luminal de los vasos sanguíneos tumorales y mediante esto se destruye la vasculatura del tumor.

Las formulaciones o medicamentos para formación de imagen y tratamiento se proporcionan de este modo, los cuales comprenden en general:

(a) una primera composición farmacéutica que comprende una cantidad diagnósticamente efectiva de una formación de enlace de aminofosfolípido etiquetada detectablemente que comprende un agente detectable operativamente unido a un anticuerpo, una proteína o ligando de enlace, o un fragmento de enlace de aminofosfolípido del mismo, que se enlaza a un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina, en la superficie luminal del tumor o en los vasos sanguíneos intratumorales del tumor vascularizado; y

(b) como mínimo una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de como mínimo un segundo anticuerpo anti-aminofosfolípido, preferiblemente una anti-fosfatidilserina o anti-fosfatidiletanolamina, o un fragmento de enlace a antígeno de los mismos.

5 En estos medicamentos, se tendrán ventajas en que la primera y segunda composiciones farmacéuticas comprenden los mismos agentes objetivos, por ejemplo, anticuerpos anti-aminofosfolípido, o fragmentos de los mismos, de la misma preparación de anticuerpos, o preferiblemente, del mismo híbrido que produce el anticuerpo.

10 En los aspectos de formación de imagen de la vasculatura de la invención, se reconoce que la formación de enlace de aminofosfolípido etiquetada detectablemente administrada, o el agente de anticuerpo detectable de anti-aminofosfolípido, puede en sí misma tener un efecto terapéutico. Mientras que esto no se excluye de la invención, las cantidades de las formaciones etiquetadas detectablemente que se van a administrar generalmente se elegirían como cantidades diagnósticamente efectivas, las cuales típicamente son menores que las cantidades requeridas para el beneficio terapéutico.

15 En las realizaciones de formación de imagen, el agente objetivo puede estar basado en anticuerpos o basado en ligando de enlaces o proteínas de enlace. Aunque no se conecta previamente con tumores o con la vasculatura del tumor, las composiciones de ligando de enlace de aminofosfolípido etiquetadas detectablemente son conocidas en la técnica y en este momento pueden, a la luz de esta motivación y la presente descripción, ser usadas en los procesos combinados de formación de imágenes y tratamiento de la presente invención. Las anexinas etiquetadas detectablemente de la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.627.036; WO 95/19791; WO 20 95/27903; WO 95/34315; WO 96/17618; y WO 98/04294; se pueden emplear de este modo.

25 Las anteriores formulaciones o medicamentos de tratamiento y de representación pueden comprender también de manera adicional uno o varios agentes anti-cancerígenos. Es decir, la presente invención comprende las formulaciones y tratamientos de combinación y de representación que comprenden en general (a) cantidades diagnósticamente efectivas de constructos de unión de aminofosfolípidos marcados de manera detectable; (b) 30 cantidades terapéuticamente efectivas de anticuerpos no conjugados anti-aminofosfolípidos, preferentemente anti-fosfatidilserina o anti-fosfatidiletanolamina, o fragmentos de unión de antígenos de los mismos; y (c) cantidades terapéuticamente efectivas de como mínimo otros agentes anti-cancerígenos.

35 En otras realizaciones, los animales o pacientes que se van a tratar mediante la presente invención se someten además a cirugía o radioterapia, o se les proporciona una cantidad terapéuticamente efectiva de como mínimo un primer agente anticáncer. El como mínimo un primer agente anticáncer en este contexto significa como mínimo un primer agente anticáncer además del anticuerpo anti-aminofosfolípido desnudo (preferentemente anti-fosfatidilserina o anti-fosfatidiletanolamina). El como mínimo un primer agente anticáncer se puede considerar, por lo tanto, que es como mínimo un segundo agente anticáncer, en donde el anticuerpo anti-aminofosfolípido desnudo es un primer 40 agente anticáncer. Sin embargo, esto es puramente materia de semántica, y el significado práctico quedará claro para los expertos en la técnica.

El como mínimo un primer agente anticáncer se puede administrar simultáneamente al animal o paciente sustancialmente con el anticuerpo anti-aminofosfolípido, o un fragmento de enlace a antígeno del mismo; tal como a partir de una sola composición farmacéutica o a partir de dos composiciones farmacéuticas administradas muy cercana una de la otra.

40 De manera alternativa, el como mínimo un primer agente anticáncer se puede administrar al animal o paciente en un momento secuencial a la administración del como mínimo un primer anticuerpo anti-aminofosfolípido, o un fragmento de enlace a antígeno del mismo. En un momento secuencial, como se usa en la presente descripción, significa escalonadas, de manera que como mínimo un primer agente anticáncer se administra al animal o paciente en un tiempo distinto a la administración de como mínimo un primer anticuerpo anti-aminofosfolípido. Generalmente, los 45 dos agentes se administran en momentos efectivamente separados para permitir que los dos agentes ejerzan sus efectos terapéuticos respectivos, es decir, se administran en intervalos de tiempo biológicamente efectivos.

50 El como mínimo un primer agente anticáncer se puede administrar al animal o paciente en un momento biológicamente efectivo antes del anticuerpo anti-aminofosfolípido o fragmento del mismo, o en un tiempo biológicamente efectivo posterior a la formación del fragmento de anticuerpo anti-aminofosfolípido. La administración de uno o más agentes anticáncer dirigidos a un no-aminofosfolípido en un tiempo terapéuticamente efectivo subsecuente al anticuerpo anti-aminofosfolípido se puede desear particularmente, en la que el agente anticáncer es una inmunotoxina de células antitumor diseñada para matar las células del tumor en la circunferencia más externa del tumor, y/o en la que el agente anticáncer es un agente anti-angiogénico diseñado para evitar la micrometástasis de cualquier célula tumoral restante. Estas consideraciones serán conocidas por los expertos en la técnica.

55 La administración de uno o más agentes anticáncer dirigidos a no-aminofosfolípidos en un tiempo terapéuticamente efectivo antes de un anticuerpo anti-aminofosfolípido se puede emplear particularmente cuando el agente anticáncer se diseña para aumentar la expresión de aminofosfolípidos. Esto se puede lograr usando agentes anticáncer que dañan, o inducen apoptosis, en el endotelio del tumor. Los agentes anticáncer, a título de ejemplo, incluyen, por

ejemplo, taxol, vincristina, vinblastina, neomicina, combretastatina (s) , podofilotoxina (s) , TNF- α , angiostatina, endostatina, vasculostatina, $\alpha_v\beta_3$ antagonistas, ionóforos de calcio, agentes que inducen el flujo de calcio, cualquier derivado o profármaco de los mismos.

5 Uno o más agentes anticáncer adicionales pueden ser agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, citoquinas, agentes anti-angiogénicos, agentes que inducen apoptosis o inmunotoxinas o coagulandos anticáncer. Agentes quimioterapéuticos, como se usan en la presente descripción, se refieren a agentes o fármacos quimioterapéuticos clásicos usados en el tratamiento de malignidades. Este término se usa para simplicidad independientemente del hecho de que otros compuestos se pueden describir técnicamente como agentes quimioterapéuticos, porque ejercen efecto anticáncer. Sin embargo, quimioterapéutico ha llegado a tener un
10 significado distinto en la técnica y se está usando de acuerdo con este significado estándar.

En la presente descripción se describen, a título de ejemplo, varios agentes quimioterapéuticos. Las personas con experiencia ordinaria en la técnica fácilmente entenderán los usos y dosis adecuadas de los agentes quimioterapéuticos, aunque las dosis se pueden reducir cuando se usan en combinación con la presente invención. Una nueva clase de fármacos que también se pueden denominar agentes quimioterapéuticos son agentes que
15 inducen la apoptosis. Cualquiera de uno o más de estos fármacos, incluyendo genes, vectores y formaciones antisentido, como sea apropiado, también se pueden usar junto con la presente invención.

Las inmunotoxinas o coagulandos anticáncer son otros agentes anticáncer adecuados. Inmunotoxinas o coagulandos anticáncer, o formaciones de agente terapéutico/agente objetivo, se basan en agentes objetivo, incluyendo anticuerpos o fragmentos de enlace de antígenos de los mismos, que se enlazan a un componente que
20 es blanco de una célula tumoral, vasculatura de tumor o estroma de tumor, y que están unidos operativamente a un agente terapéutico, generalmente un agente citotóxico (inmunotoxina) o factor de coagulación (coagulando) . Un componente dirigible de una célula de tumor, vasculatura de tumor o estroma de tumor, preferiblemente es un componente que se expresa en superficie, accesible en superficie o localizado en superficie, aunque los componentes liberados de células tumorales necróticas o dañadas de otra manera, o las células endoteliales vasculares también pueden ser el blanco, incluyendo los antígenos de células tumorales citosólicas y/o nucleares.
25

Se pueden usar tanto agentes de objetivo de anticuerpo y no anticuerpo, incluyendo factores de crecimiento, tales como VEGF y FGF; péptidos que contienen el tripéptido R-G-D, que se enlazan específicamente a la vasculatura del tumor; y otros componentes objetivo, tales como anexinas y ligandos relacionados.

Las inmunotoxinas o coagulandos de células antitumores pueden comprender anticuerpos ejemplificados mediante el grupo que consiste en B3 (ATCC HB 10573) , 260F9 (ATCC HB 8488) , D612 (ATCC HB 9796) y KS1/4, este anticuerpo KS1/4 obtenido a partir de una célula que comprende el vector pGKC2310 (NRRL B-18356) o el vector pG2A52 (NRRL B-18357) .
30

Las inmunotoxinas o coagulandos de estromas antitumor generalmente comprenden anticuerpos que se enlazan a un componente de tejido conectivo, un componente de membrana de base o un componente de plaqueta activada; como se ejemplifica enlazándose a fibrina, RIBS o LIBS.
35

Las inmunotoxinas o coagulandos de vasculatura antitumor pueden comprender ligandos, anticuerpos o fragmentos de los mismos, que se enlazan a un componente expresado en superficie, accesible en superficie o localizado en superficie de los vasos de transporte de sangre, preferiblemente los vasos sanguíneos intratumorales, de un tumor vascularizado. Estos anticuerpos incluyen aquellos que se enlazan a componentes expresados en
40 superficie de los vasos sanguíneos intratumorales de un tumor vascularizado, incluyendo los mismos aminofosfolípidos, y los receptores de superficie de células de la vasculatura intratumoral, tales como endoglina (anticuerpos TEC-4 y TEC-11) , un receptor TGF β , selectina-E, selectina-P, VCAM-1, ICAM-1, PSMA, un receptor VEGF/VPF, un receptor FGF, un TIE, integrina $\alpha_v\beta_3$, pleiotropina, endosialina y proteínas MHC Clase II. Los anticuerpos también se pueden enlazar a componentes inducibles por citoquina o inducibles por coagulante de los
45 vasos sanguíneos intratumorales.

Otras inmunotoxinas o coagulandos de vasculatura antitumor pueden comprender anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que se enlazan a un factor de crecimiento o ligando que se enlaza a un receptor de superficie de célula de vasculatura intratumoral. Estos anticuerpos incluyen aquellos que se enlazan con VEGF/VPF (anticuerpos GV39 y GV97) , FGF, TGF β , un ligando que se enlaza a un TIE, una isoforma de fibronectina asociada con tumor, factor de dispersión/factor de crecimiento de hepatocito (HGF) , factor de plaqueta 4 (PF4) , PDGF y TIMP. Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, también se pueden unir a un complejo de ligando:receptor o a un complejo de factor de crecimiento:receptor, pero no el ligando o factor de crecimiento, o al receptor, cuando el ligando o factor de crecimiento o el receptor no está en el complejo de ligando:receptor o factor de crecimiento:receptor.
50

Las formaciones de célula antitumor, estroma antitumor o agente terapéutico-anticuerpo de vasculatura antitumor pueden comprender agentes citotóxicos, tales como toxinas derivadas de plantas, hongos o bacterias (inmunotoxinas) . Frecuentemente se preferirá la cadena de ricina A y ricina A desglucosilada, y gelonina y angiopoyetinas también se tendrán en cuenta. Las formaciones de células antitumor, estroma antitumor o agente terapéutico-anticuerpo de vasculatura antitumor pueden comprender factores de coagulación o segundas regiones
55

de enlace con anticuerpos que se enlazan a los factores de coagulación (coagulandos) . La asociación operativa con el Factor de Tejido o los derivados del Factor de Tejido, tales como el Factor de Tejido truncado, frecuentemente se preferirán.

5 La presente invención da a conocer además una serie de equipos (kits) terapéuticos novedosos, medicamentos y/o cócteles para su uso, junto con la invención. Los equipos, medicamentos y/o cócteles generalmente comprenden una cantidad efectiva combinada de un agente anticáncer y un anticuerpo, o un fragmento de enlace a antígeno del mismo, que se enlaza a un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina.

10 En el caso en el que el objetivo primario de este conjunto o equipo es la terapia de combinación, el equipo puede comprender además de manera adicional un componente de representación, en general una cantidad eficaz desde el punto de vista diagnóstico de un constructo de unión de aminofosfolípido marcado de manera detectable, tal como un anticuerpo anti-aminofosfolípido de marcado o un fragmento de unión de antígeno del mismo.

15 Los equipos y medicamentos comprenderán, preferiblemente en elementos contenedores adecuados, una cantidad biológicamente efectiva de como mínimo un primer anticuerpo, o un fragmento de enlace a antígeno del mismo, que se enlaza a un aminofosfolípido, preferiblemente fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina; en combinación con una cantidad biológicamente efectiva de como mínimo un primer agente anticáncer. Los componentes de los equipos y medicamentos se pueden disponer dentro de un solo contenedor o elemento contenedor, o disponer dentro de distintos contenedores o elementos contenedores. Los cócteles generalmente se mezclarán entre sí para uso combinado.

20 La gama entera de formación de anticuerpos anti-aminofosfolípidos, como se describió anteriormente, se puede emplear en los equipos, medicamentos y/o cócteles, siendo preferente con anticuerpos humanos, humanizados, monoclonales, anti-PS y anti-PE, o fragmentos de los mismos. Los agentes anticáncer son aquéllos como se describieron anteriormente, incluyendo agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, agentes apoptóticos, inmunotoxinas y coagulandos. Los agentes formulados para administración intravenosa frecuentemente serán los preferentes.

25 Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación, y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en la presente descripción.

30 Figura 1A y Figura 1B. Actividad de anti-VCAM-1•tTF unido a la célula *in vitro*. Figura 1A. Enlace del coagulando anti-VCAM-1•tTF con células bEnd.3 no estimuladas (de control) y activadas con IL-1 α . Figura 1B. Generación del factor Xa por coagulando anti-VCAM-1•tTF ligado a la célula.

35 Figura 2. Retardo de crecimiento de tumores L540 en ratones tratados con anti-VCAM-1•tTF. Ratones que llevan el tumor L540 se inyectaron intravenosamente, ya sea con solución salina, 20 μ g de anti-VCAM-1•tTF, 4 μ g de tTF no conjugado, o 20 μ g de IgG•tTF de control. Las inyecciones se repitieron en el día 4 y 8 después del primer tratamiento. Los tumores se midieron diariamente. Se muestra el volumen medio del tumor y la SD (desviación estándar) de 8 ratones por grupo.

40 Figura 3. La activación del coagulando en bloques de Anexina V del Factor X *in vitro*. Se incubaron células bEnd.3 estimuladas con IL-1 α con coagulando anti-VCAM-1•tTF en placas de microtitulación de 96 pocillos, como se describe en el Ejemplo V. La anexina V se añadió a concentraciones que varían de 0, 1 a 10 μ g/mililitro (como se muestra) , y las células se incubaron durante 30 minutos antes de la adición de Proplex T diluido. La cantidad de Factor X_a generado en la presencia o ausencia de Anexina V se determinó usando un sustrato cromogénico, como se describe en el Ejemplo V.

45 Figura 4A y Figura 4B. Efectos antitumor de anticuerpos anti-PS naturales o desnudos en animales con tumores singénicos y xenogénicos. 1×10^7 células de carcinoma colorrectal murino Colo 26 (Figura 4A) , o linfoma de Hodgkin humano L540 (Figura 4B) se inyectaron simultáneamente en el flanco derecho de ratones Balb/c (Figura 4A) , o ratones machos CB17 SCID (Figura 4B) , respectivamente. Los tumores se dejaron crecer a un tamaño de aproximadamente 0, 6-0, 9 cm³, y luego los ratones (4 animales por grupo) se inyectaron intraperitonealmente con 20 μ g de anticuerpo anti-PS natural (cuadros abiertos) o solución salina (círculos abiertos) (IgM de ratón de control dio resultados similares que la solución salina) . El tratamiento se repitió 3 veces con un intervalo de 48 horas. Los animales se inspeccionaron diariamente para mediciones de tumor y peso corporal. El volumen del tumor se calculó como se describe en el Ejemplo VII. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron 2 cm³, o antes si los tumores mostraron signos de necrosis o ulceración.

Descripción de realizaciones ilustrativas

A. Destrucción de tumor usando coagulando VCAM-1

Los tumores sólidos y carcinomas son más del 90 por ciento de todos los cánceres en el hombre. Aunque el uso de anticuerpos monoclonales e inmunotoxinas se ha investigado en la terapia de linfomas y leucemias (Vitetta y otros, 1991) , estos agentes han sido desafortunadamente ineficaces en ensayos clínicos contra carcinomas y otros tumores sólidos (Abrams y Oldham, 1985) . Una razón principal para la ineficacia de los tratamientos basados en anticuerpos es que las macromoléculas no se transportan fácilmente a los tumores sólidos. Aun cuando ya están dentro de una masa tumoral, estas moléculas fallan en distribuirse uniformemente, debido a la presencia de uniones fuertes entre las células de tumores, estroma fibroso, gradientes de presión intersticial y barreras del sitio de unión (Dvorak y otros, 1991) .

Para desarrollar nuevas estrategias para tratar tumores sólidos, los métodos que involucran el ataque a la vasculatura del tumor, en vez de a las células del tumor, ofrecen distintas ventajas. Una destrucción efectiva o bloqueo de los vasos del tumor detiene el flujo sanguíneo a través del tumor y da como resultado una avalancha de la muerte celular del tumor. Las formaciones de anticuerpo-toxina y anticuerpo-coagulante han sido ya usadas con elevada efectividad en el ataque específico y destrucción de vasos del tumor, dando como resultado la necrosis del tumor (Burrows y otros, 1992; Burrows y Thorpe, 1993; WO 93/17715; WO 96/01653; Huang y otros, 1997) .

Se describen agentes citotóxicos para el ataque de la vasculatura de tumores en las siguientes patentes: Patentes U.S.A. N^{os}. 5.855.866; 5.776.427, 5.863.538; 5.660.827; 6.004.554; 5.965.132 y 6.051.230. Se describen coagulantes para ataque tumoral en las siguientes patentes: Patentes U.S.A. N^{os} 5.855.866; 5.877.289; 5.965.132; 6.004.555; 6.036.955; y 6.093.399.

Cuando se usan anticuerpos, factores de crecimiento u otros ligandos de enlace para administrar específicamente un coagulante a la vasculatura del tumor, estos agentes se denominan coagulandos. Un coagulante actualmente preferente para su uso en coagulandos es el Factor de Tejido truncado (tTF) (Huang y otros, 1997; WO 96/01653; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.877.289) . El TF (Factor de Tejido) es un iniciador importante de la coagulación de la sangre (Ruf y otros, 1991) . En sitios de lesiones, el Factor VII/VIII en la sangre se pone en contacto y se enlaza con el Factor de Tejido en las células en los tejidos perivasculares. El complejo TF:VIII, 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, un coágulo sanguíneo (Ruf y Edgington, 1994) .

La forma recombinante truncada del factor de tejido (tTF) , que carece de los dominios citosólicos y de transmembrana, es una proteína soluble que tiene aproximadamente cinco órdenes de magnitud de coagulación más baja que inducen la capacidad que el factor de tejido natural (Stone y otros, 1995; Huang y otros, 1997) . Esto se debe a que el factor de tejido necesita asociarse con fosfolípidos para el complejo con VIII para activar el IXa o Xa eficientemente. Sin embargo, cuando tTF se administra al endotelio vascular del tumor por medio de un anticuerpo o agente objetivo, se pone nuevamente en proximidad con una superficie de lípido y recupera la actividad trombogénica (Huang y otros, 1997; Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.877.289; 6.004.555; y 6.093.399) . Por lo tanto, se crea un coagulando que trombosa selectivamente la vasculatura del tumor.

El factor de tejido truncado tiene varias ventajas que recomiendan su uso en coagulandos dirigidos al tejido vascular: el tTF humano está fácilmente disponible, y la proteína humana tendrá inmunogenicidad despreciable o baja en el hombre; tTF humano es completamente funcional en animales experimentales, incluyendo ratones; y tTF objetivo es muy potente, debido a que dispara la activación de una cascada de proteínas de coagulación, dando un efecto muy amplificado (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.877.289; 6.004.555 y 6.093.399) .

Se ha descrito una gama de moléculas objetivo adecuadas que están disponibles en el endotelio del tumor, pero muy ausentes del endotelio normal. Por ejemplo, se pueden utilizar objetivos expresados, tales como endogлина, selectina-E, selectina-P, VCAM-1, ICAM-1, PSMA, un TIE, un ligando reactivo con LAM-1, un receptor VEGF/VPF, un receptor FGF, integrina $\alpha_v\beta_3$, pleiotropina o endosialina (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.855.866; 5.877.289; Burrows y otros, 1992; Burrows y Thorpe, 1993; Huang y otros, 1997; Liu y otros, 1997; Ohizumi y otros, 1997) .

Los objetivos adsorbidos son otro grupo adecuado, tales como VEGF, FGF, TGF β , HGF, PF4, PDGF, TIMP, un ligando que se enlaza con un TIE o una isoforma de fibronectina asociada con un tumor (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.877.289; 5.965.132 y 6.004.555) . Las isoformas de fibronectina son ligandos que se enlazan a la familia de integrina de los receptores. Las isoformas de fibronectina asociadas con tumores son componentes dirigibles, tanto de la vasculatura del tumor como del estroma del tumor. El anticuerpo monoclonal BC-1 (Carnemolla y otros, 1989) específicamente se enlaza a las isoformas de fibronectinas asociadas con tumor.

Otros objetivos inducibles mediante el ambiente del tumor natural o que siguen la intervención del hombre también son entidades direccionables, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.776.427; 5.863.538 y 6.036.955. Cuando se usa junto con la supresión anterior en tejidos normales y para

inducción vascular del tumor, también se pueden emplear los antígenos MHC Clase II como objetivos (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.776.427; 5.863.538; 6.004.554 y 6.036.955) .

Un objetivo preferente para aplicaciones clínicas es la molécula de adhesión endotelial vascular-1 (VCAM-1) (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.855.866; 5.877.289; 6.004.555 y 6.093.399) . La VCAM-1 es una molécula de adhesión celular que se induce mediante citocinas inflamatorias IL-1 α , IL-4 (Thornhill y otros, 1990) y TNF α (Munro, 1993) , cuyo papel *in vivo* es reclutar leucocitos en sitios de inflamación aguda (Bevilacqua, 1993) .

La VCAM-1 está presente en células endoteliales vasculares en muchos tumores malignos humanos, incluyendo el neuroblastoma (Patey y otros, 1996) , carcinoma renal (Droz y otros, 1994) , carcinoma de pulmón no pequeño (Staal-van den Brekel y otros, 1996) , enfermedad de Hodgkin (Patey y otros, 1996) , y angiosarcoma (Kuzu y otros, 1993) , así como en tumores benignos, tales como angioma (Patey y otros, 1996) y hemangioma (Kuzu y otros, 1993) . La expresión constitutiva de la VCAM-1 en el hombre se confina a sólo algunos vasos en la tiroides, el timo y el riñón (Kuzu y otros, 1993; Bruijn y Dinklo, 1993) , y en el ratón a vasos en el corazón y el pulmón (Fries y otros, 1993) .

Ciertos datos presentados en la presente descripción suplementan aún más los proporcionados en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.855.855; 5.877.289 y 6.004.555, y muestran la inducción selectiva de trombosis e infarto de tumor resultante de la administración del coaguligando anti-VCAM-1+tTF. Los resultados presentados se generan usando ratones que tenían linfoma de Hodgkin humano L540. Cuando se cultivan como xenoinjerto en ratones SCID, este tumor muestra una similitud cercana a la enfermedad humana con respecto a la expresión de citocinas inflamatorias (Diehl y otros, 1985) , y la presencia de la VCAM-1 y otras moléculas de activación celular endoteliales en su vasculatura.

Usando un coaguligando anti-VCAM-1+tTF covalentemente enlazado, en el cual tTF se enlaza directamente al anticuerpo anti-VCAM-1, se muestra en la presente descripción que el coaguligando se localiza selectivamente en vasos de tumor, induce trombosis de aquellos vasos, causa que la necrosis se desarrolle en todo el tumor y retarda el crecimiento del tumor en los ratones que tienen tumores Hodgkin L540 sólidos. Los tumores generalmente necesitan tener como mínimo aproximadamente 0, 3 centímetros de diámetro para responder al coaguligando, debido a que la VCAM-1 estaba ausente de tumores más pequeños. Presumiblemente, en los tumores pequeños, los niveles de citocinas segregadas por las células del tumor o las células huésped que infiltran al tumor son demasiado bajas para la inducción de la VCAM-1. Esto se da de acuerdo con los estudios en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.855.866; 5.877.289; 5.776.427; 6.004.555 y 6.036.955, en las que las invenciones mostraron ser más útiles en tumores sólidos más grandes.

Aunque inicialmente la mancha de VCAM-1 se observó más en la periferia del tumor, el coaguligando evidentemente se enlaza con los vasos de transporte de sangre y tapa de los mismos - - ya que es capaz de detener 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 probablemente conduce a la inducción adicional de la VCAM-1 en los vasos centrales (Sluiter y otros, 1993) , dando como resultado una señal amplificada y la destrucción evidente de la región intratumoral. Este tipo de expresión inducida por coagulante de marcadores dirigibles adicionales, y por lo tanto la amplificación de señal, también se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6.004.555.

B. Mecanismo de la destrucción del tumor dirigida con VCAM-1

Como se muestra en la presente descripción, aunque la localización en los vasos que expresan la VCAM-1 en el corazón y pulmones de los ratones se observó después de la administración de un coaguligando anti-VCAM-1, esta formación no induce a trombosis en estos sitios que no son del tumor. Además, el coaguligando anti-VCAM-1 no fue más tóxico para los ratones de lo que fue el coaguligando de control de especificidad irrelevante, lo que indica nuevamente que la expresión constitutiva de la VCAM-1 en los vasos del corazón y del pulmón no conduce a la toxicidad. Estos datos son importantes para el progreso clínico inmediato de la terapia de coaguligandos, dado que la VCAM-1 es un marcador que se presenta naturalmente del endotelio vascular del tumor en humanos. Sin embargo, este fenómeno también proporcionó a los inventores una idea única, conduciendo a enfoques totalmente diferentes para la destrucción de la vasculatura del tumor.

Los inventores buscaron entender el mecanismo detrás de la capacidad del coaguligando anti-VCAM-1 para enlazarse con la VCAM-1 constitutivamente expresada en los vasos sanguíneos en el corazón y los pulmones, y no causar todavía trombosis en estos vasos. Hay numerosas posibilidades científicas para esta observación empírica, generalmente conectadas con la naturaleza protrombótica del ambiente del tumor con alguna predisposición fibrinolítica en el corazón y los pulmones.

Generalmente, hay un equilibrio biológico entre el sistema de coagulación (depósito de fibrina) y el sistema fibrinolítico (degradación de fibrina mediante enzimas) . Sin embargo, en enfermedad maligna, particularmente carcinomas, este equilibrio se rompe, dando como resultado la activación anormal de la coagulación (hipercoagulabilidad o el estado protrombótico) . La evidencia también indica que varios componentes de estas

trayectorias pueden contribuir a características desordenadas de la malignidad, tales como la proliferación, invasión, y metástasis (Zacharski y otros, 1993) .

Donati (1995) revisó la interacción compleja entre observaciones clínicas originales de las complicaciones trombóticas de las enfermedades malignas, y el progreso subsecuente en la biología celular y bioquímica de las actividades celulares del tumor. Sin embargo, a pesar de investigación extensa, no se pudo proporcionar una explicación molecular clara de la naturaleza protrombótica del ambiente del tumor (Donati, 1995) . Donati sí hizo énfasis, sin embargo, en el papel de las células del tumor en el proceso. Se explicó que las células del tumor expresan actividades procoagulantes, tales como la tromboplastina del tejido y el procoagulante de cáncer (CP) (Donati, 1995) . La Publicación Internacional WO 91/07187 también informó de una actividad procoagulante de las células de tumores.

Otros numerosos estudios también han identificado las células del tumor en sí mismas como responsables del estado protrombótico dentro de un tumor. Por ejemplo, Nawroth y otros (1988) dio a conocer que el factor o los factores elaborados por las células de sarcoma aumentan la respuesta procoagulante del endotelio cercano a TNF. Estos autores informaron sobre la formación de fibrina ocurrida a través del lecho vascular del tumor 30 minutos después de la infusión de TNF, pero que no se observaron depósitos de fibrina y agregados de plaquetas en la vasculatura normal (Nawroth y otros, 1988) . El TNF después mostró que aumentaba la expresión del factor de tejido en la superficie de las células endoteliales (Murray y otros, 1991) . Esto se propuso para explicar estudios anteriores que muestran que las células endoteliales cultivadas incubadas con TNF recombinante han aumentado la actividad procoagulante, el factor de tejido, y la supresión concomitante de la trayectoria de proteína C, un mecanismo anti-trombótico que funciona en la superficie de células endoteliales quiescentes (Nawroth y otros, 1985; Nawroth y Stern, 1986) .

Datos de Sugimura y otros, (1994) también comprenden las células tumorales como los componentes clave de la actividad procoagulante del tumor. Se dio a conocer que cuatro líneas celulares de tumores eran capaces de soportar diferentes etapas de la trayectoria extrínseca de coagulación (Sugimura y otros, 1994) . Otro estudio dio a conocer que la línea celular del carcinoma de ovario humano, OC-2008, constitutivamente expresó actividad del Factor de Tejido de membrana superficial y mostró actividad compleja de protrombinasa dependiente de la superficie celular (Rao y otros, 1992) . Connor y otros, (1989) , además sugirió que son las células patológicas las que controlan la coagulación. Sus resultados indican que las células eritroleucémicas de murinas no diferenciadas, tumorigénicas, muestran un aumento de 7 a 8 veces en la potencia de su actividad procoagulante (Connor y otros, 1989) .

Zacharski y otros, (1993) también enfocaron hacia células de tumor y buscaron definir el modo de interacción de las células de carcinoma de ovario con las trayectorias de coagulación (iniciada por procoagulante) y fibrinólisis (iniciada por activador plasminógeno tipo uroquinasa, u-PA) . Dieron a conocer que las células de tumor expresaron las trayectorias del Factor de Tejido y de coagulación intermedias que dieron como resultado la generación de trombina local - - como se evidencia mediante la conversión de fibrinógeno, presente en el tejido conectivo del tumor, a la fibrina que fue encontrada para adherirse a las superficies de los nódulos del tumor y las células de tumor individuales. La fibrina detectada no sirvió como base de necrosis o de infiltrado celular inflamatorio local (Zacharski y otros, 1993) . Estos autores concluyeron que existía una trayectoria procoagulante asociada con célula de tumor dominante que conduce a la generación de trombina e hipercoagulabilidad.

Otras hipótesis han propuesto que son los cambios en los vasos de sangre del tumor los que vuelven a estos vasos más capaces de soportar la formación de trombos y/o menos capaces de disolver la fibrina. Por ejemplo, se ha informado que los vasos del tumor muestran regulación hacia arriba del Factor de Tejido, regulación hacia abajo de activadores de plasminógeno y/o regulación hacia arriba del inhibidor de activadores de plasminógeno, PAI-1 (Nawroth y Stern, 1986; Nawroth y otros, 1988) . Estos efectos se cree que se amplifican por factores derivados del tumor (Murray y otros, 1991; Ogawa y otros, 1990) , posiblemente VEGF.

Por ejemplo, Ogawa y otros (1990) dieron a conocer que la hipoxia causó que las propiedades coagulantes de superficie celular endotelial se cambiaran para promover la activación de la coagulación. Esto fue acompañado por la supresión del cofactor anticoagulante, la trombomodulina, y la inducción de un activador del factor X, distinto de los sistemas clásicos extrínseco e intrínseco (Ogawa y otros, 1990) . Asimismo, pudo haber un aumento en la concentración local de los Factores VIIa, IXa, Xa, u otras moléculas que interactúan con el Factor de Tejido, dentro de los vasos del tumor, estimulando, por lo tanto, la trombosis.

Adicionalmente, las plaquetas son un componente importante de cualquier estado procoagulante. Recientemente, el potencial procoagulante de las plaquetas ha sido ligado a su capacidad para cubrir micropartículas procoagulantes de la membrana del plasma (Zwaal y otros, 1989; 1992; Dachar y -Prigent y otros, 1996) . Se ha propuesto que una proporción creciente de micropartículas circulantes, vesículas o fragmentos de membranas de las plaquetas contribuye a los estados pretrombóticos (protrombótico) en varias condiciones patológicas (Zwaal y otros, 1989; 1992; Dachar y -Prigent y otros, 1996; página 159) . McNeil y otros (1990) también dieron a conocer que la β_2 - GPI ejerce múltiples efectos inhibitorios en la coagulación y la agregación de plaquetas. La biología de las plaquetas de tumor podría explicar, por lo tanto, la efectividad de un coagulando anti-VCAM-1.

Otras explicaciones tentativas incluyen la simple posibilidad de que la VCAM-1 se exprese en niveles más altos en los vasos del tumor que en los vasos de sangre en el corazón y los pulmones, probablemente debido a la inducción de las citocinas derivadas del tumor, y que el enlace con los vasos saludables no puede subir el balance en trombosis sostenida. También los mecanismos fibrinolíticos podrían ser regulados hacia arriba en el corazón, como se ejemplifica por un inhibidor de la trayectoria de Factor de Tejido incrementada (TFPI) , activadores de plasminógeno aumentados, y/o inhibidores de activador de plasminógeno disminuidos. Si la fisiología fibrinolítica del corazón y los vasos del pulmón demuestran ser la mayor razón que está por debajo de los efectos específicos del tumor del coagulando anti-VCAM-1, esto generalmente evitaría el desarrollo de terapias adicionales antitumor dirigidas a los aspectos únicos de la biología del tumor.

5 A pesar de todas las opciones posibles, los inventores razonaron que un fallo del coagulando anti-VCAM-1 para causar trombosis en vasos de tejidos normales se debe a la ausencia de aminofosfolípido, fosfatidilserina (PS) , de la superficie luminal de estos vasos. Para completar la teoría, por lo tanto, no sólo tendría que mostrar la fosfatidilserina que estaba ausente de estos vasos normales, sino su presencia en el lado luminal de los vasos asociados con tumores tendría que demostrarse de manera concluyente.

10 Los inventores por lo tanto usaron manchado inmunohistoquímico para evaluar la distribución de un anticuerpo anti-fosfatidilserina monoclonal (anti-PS) inyectado intravenosamente en ratones que tienen tumor. Estos estudios revelaron que los vasos que expresan VCAM-1 en el corazón y los pulmones carecían de PS, mientras que los vasos que expresan VCAM-1 en el tumor expresaron PS. La necesidad para la expresión superficial de PS en la acción de coagulando se indica además por el descubrimiento de los inventores de que la anexina V, la cual
 15 enlaza con PS, bloquea la acción del coagulando anti-VCAM-1•tTF, tanto *in vitro* como *in vivo*.

20 La falta de efecto trombótico del coagulando anti-VCAM-1 en vasos del corazón y pulmón normales se puede explicar, por lo tanto, como mínimo en parte: la ausencia de aminofosfolípido, fosfatidilserina, significa que los vasos normales carecen de una superficie procoagulante, sobre la cual se pueden formar los complejos de coagulación. En ausencia de PS en la superficie, el anti-VCAM-1•tTF se enlaza con la VCAM-1 que expresa los vasos de corazón y pulmón, pero no puede inducir trombosis. En cambio, los vasos que expresan VCAM-1 en el tumor muestran
 25 expresión coincidente de PS de superficie. El coagulando se enlaza, por lo tanto, con los vasos del tumor y activa los factores de coagulación localmente para formar un trombo oclusivo.

Además de delinear los efectos trombóticos específicos del tumor de los coagulandos anti-VCAM-1, la expresión específica del aminofosfolípido, fosfatidilserina, en la superficie luminal de los vasos sanguíneos del tumor también
 30 permitió a los inventores explicar el fenotipo protrombótico observado, pero no entendido, en estudios anteriores (Zacharski y otros, 1993; Donati, 1995) . En vez de deberse predominantemente a células de tumor o factores elaborados: plaquetas, micropartículas procoagulante o fragmentos de membrana; o debido a desequilibrios en la tromboplastina, trombomodulina, procoagulante de cáncer, Factor de Tejido, trayectoria de proteína C, activadores de plasminógeno o inhibidores de activador de plasminógeno (por ejemplo, PAI-1) , los estudios de los inventores indican que es la expresión de PS la que representa un papel significativo en el estado protrombótico de la
 35 vasculatura del tumor.

C. Aminofosfolípidos como marcadores de la vasculatura del tumor

Siguiendo su descubrimiento de que el aminofosfolípido representativo, fosfatidilserina, se expresaba específicamente en la superficie luminal de los vasos sanguíneos del tumor, pero no en los vasos sanguíneos
 40 normales, los inventores razonaron que los aminofosfolípidos tenían potencial como objetivos para la intervención terapéutica. La presente invención comprende, por lo tanto, dirigir en el tratamiento de tumores los constituyentes aminofosfolípidos, particularmente fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE) . Aunque los efectos anti-tumor a partir del ataque o administración dirigida de aminofosfolípido se demuestran en la presente descripción, usando modelos de animales aceptados en la técnica, la capacidad de los aminofosfolípidos para actuar como marcadores
 45 dirigibles tan seguros y efectivos de la vasculatura del tumor no podría haberse predicho de los estudios anteriores.

Por ejemplo, aunque los vasos del tumor generalmente son de naturaleza protrombótica, en oposición a otros vasos sanguíneos, es una propiedad inherente del tumor mantener una red de vasos sanguíneos con el fin de administrar oxígeno y nutrientes a las células del tumor. Evidentemente, los vasos sanguíneos asociados al tumor no pueden
 50 predisponerse de esa manera hacia la trombosis, de manera que espontánea y fácilmente soporten la coagulación, ya que la coagulación necesariamente causaría que el tumor se autodestruyera. Por lo tanto, se espera que un marcador de vaso de tumor asociado con trombosis, tal como la fosfatidilserina identificada actualmente, pudiera descubrirse que se expresa en cantidades suficientes para permitir la intervención terapéutica efectiva dirigiéndola, y así se expresa a niveles suficientemente bajos para mantener ordinariamente el flujo sanguíneo a través del tumor.

La presente identificación de aminofosfolípidos como objetivos de vasculatura de tumor efectivos y seguros es aún
 55 más sorprendente, dado que (1) las anteriores especulaciones con respecto al papel de otros tipos de células y/o varios factores, activadores e inhibidores que están por debajo del estado protrombótico, complejo, del tumor (tal como se comentó anteriormente) ; y (2) el estado de confusión y contradictorio de la técnica con respecto a la biología de los aminofosfolípidos, en términos tanto de la expresión como de la función en varios tipos de células.

La fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina normalmente son segregadas hacia la superficie interna de la bicapa de membrana de plasma en diferentes células (Gaffet y otros, 1995; Julien y otros, 1995) . En cambio, la hoja externa de la membrana de bicapa es rica en análogos de fosfatidilcolina (Zwaal y otros, 1989; Gaffet y otros, 1995) . Esta segregación de lípidos crea una transbicapa asimétrica. Aunque la existencia de asimetría de membrana se ha discutido durante algún tiempo, la razón para su existencia y los mecanismos para su generación y control se entienden mal (Williamson y Schlegel, 1994) , particularmente en células distintas de las plaquetas.

Hay incluso numerosos informes contradictorios con respecto a la presencia o ausencia de PS y PE en diferentes células y tejidos, menos aún concerniente al papel probable que estos aminofosfolípidos pueden jugar. Por ejemplo, los muchos estudios de PS conducidos con plaquetas, componentes claves en la coagulación de la sangre (Dachar y -Prigent y otros 1996) , han producido resultados muy variables. Bevers y otros, (1982) midieron la actividad de conversión de protrombina de plaquetas, de plaquetas no activadas después del tratamiento con varias fosfolipasas o enzimas proteolíticas. Concluyeron que la fosfatidilserina negativamente cargada, y posiblemente el fosfatidilinositol, estaban involucrados en la actividad de conversión de protrombina de plaquetas no activadas (Bevers y otros, 1982) .

Bevers y otros, (1983) informaron entonces sobre una exposición aumentada de fosfatidilserina, y una exposición disminuida de esfingomielinasa, en plaquetas activadas. Sin embargo, estas alteraciones fueron mucho menos aparentes en las plaquetas activadas, ya sea por trombina o por colágeno solamente, en contraste con colágeno más trombina, diamida, o un ionóforo de calcio (Bevers y otros, 1983) . La expresión de superficie de PS en respuesta a la diamida se contradujo por estudios en eritrocitos, los cuales no mostraron ninguna exposición de PS estimulada por diamida (de Jong y otros, 1997) . Aunque haciendo eco a sus resultados anteriores, Bevers y sus colegas dieron a conocer más adelante que los cambios en la interacción de citoesqueleto en la membrana del plasma, particularmente la degradación aumentada de la proteína de enlace de actina citoesquelética, fue importante para los cambios superficiales de las plaquetas (Bevers y otros, 1985; páginas 368-369) .

Maneta-Peyret y otros (1989) también informaron sobre la detección de PS en plaquetas humanas. Estos autores notaron que la superficie procoagulante de la plaqueta podría formarse mediante fosfolípidos cargados negativamente, tales como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (generalmente neutros o zwitteriónicos) , o ambos. El papel de la fosfatidilserina en el proceso de coagulación ha sido cuestionado en favor de la fosfatidiletanolamina (Maneta-Peyret y otros, 1989; Schick y otros, 1976; 1978) . Por ejemplo, los estudios han dado a conocer que 18 por ciento de la fosfatidiletanolamina se vuelve accesible en superficie después de 2 horas, en contraste con cero fosfatidilserina (Schick y otros, 1976) .

Estudios actuales con plaquetas también dieron a conocer que muestran un aumento adicional de 16 por ciento en la exposición de fosfatidiletanolamina después del tratamiento con trombina, sin aumento en los niveles de fosfatidilserina (Schick y otros, 1976) . Por lo tanto, se dice que PS no es un componente de la superficie funcional de la membrana de plasma de las plaquetas (Schick y otros, 1976; 1978) . No obstante, la evidencia actual sí parece indicar que tanto la PS como PE están mezcladas en la asimetría de fosfolípidos observada en la membrana externa de las plaquetas y eritrocitos, y que PS está participando en la actividad procoagulante de las plaquetas (Gaffet y otros, 1995; de Jong y otros, 1997; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.627.036) .

Los mecanismos para lograr y mantener la distribución de aminofosfolípido diferencial, y en especial la significación funcional de hacerlo, desde hace mucho tiempo son el objeto de especulaciones controversiales. Al revisar la regulación del movimiento de fosfolípidos de transbicapa, Williamson y Schlegel (1994) indicaron que elevando el Ca^{2+} intracelular se permite que las clases más grandes de fosfolípidos se muevan libremente a través de la bicapa, mezclando los lípidos y disipando la asimetría. De Jong y otros (1997) también dieron a conocer que el aumento de calcio intracelular conduce a un mezclado rápido de la bicapa de lípidos y la exposición de PS, lo cual podría ser parcialmente inhibido por la oxidación celular. La interacción de los aminofosfolípidos con proteínas citoesqueléticas también ha sido propuesta como un mecanismo para regular la asimetría de fosfolípidos de la membrana (Zwaal y otros, 1989) .

Gaffet y otros (1995) declararon que la redistribución transversal de fosfolípidos durante la activación de las plaquetas humanas se logra mediante un flujo hacia afuera vectorial de los aminofosfolípidos, no contraequilibrado por un flujo recíproco rápido de fosfolípidos con cabeza de colina, es decir, sin mezclarse. Sugirieron que el flujo hacia afuera vectorial específico de los aminofosfolípidos podría ser catalizado mediante una actividad translocasa de aminofosfolípidos inversa (Gaffet y otros, 1995) . Una hipótesis de alternativa sería que la actividad de una translocasa hacia adentro fue inhibida. Zwaal y otros (1989) propusieron la participación de una translocasa-fosfolípido que catalizó tanto el movimiento hacia afuera como hacia adentro de los aminofosfolípidos.

La presencia de una actividad translocasa de aminofosfolípidos dependiente de energía y dependiente de proteína que transporta fosfatidiletanolamina a partir de la hoja externa hacia la hoja interna de la bicapa de lípidos fue dada a conocer por Julien y otros (1993) . A continuación los inventores mostraron que la actividad translocasa de aminofosfolípidos podría también transferir fosfatidilserina, y que la actividad podría ser mantenida, suprimida y restaurada, dependiendo de las condiciones de la incubación celular (Julien y otros, 1993) , e inhibidas por el promotor del tumor, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Julien y otros, 1997) .

Una escramblasa de fosfolípido de 35 kD que promueve el movimiento bidireccional dependiente de Ca^{2-} de la fosfatidilserina y otros fosfolípidos recientemente se clonó a partir de una biblioteca de ADNc (Zhou y otros, 1997) . Esta proteína escramblasa PL es una proteína de membrana de plasma tipo II, rica en prolina, con un solo segmento de transmembrana cerca del término C. Estudios posteriores confirmaron que esta proteína era responsable del movimiento rápido de los fosfolípidos desde las hojas de membrana de plasma interna a externa en las células expuestas a elevadas concentraciones de calcio citosólico (Zhao y otros, 1998) .

La actividad translocasa de aminofosfolípido sobre la que informaron Julien y otros (1993; 1997) , la cual transporta PS y PE a partir de la hoja externa a la interna, es diferente a la escramblasa dependiente de Ca^{2+} bidireccional (Zhou y otros, 1997; Zhao y otros, 1998) . La escramblasa es activada por Ca^{2+} , y principalmente funciona para mover la PS desde la hoja interna a la externa como respuesta a los niveles aumentados de Ca^{2+} . En este momento se cree generalmente que la translocasa de aminofosfolípidos mantiene la asimetría de la membrana durante condiciones normales, pero que la escramblasa es activada por el influjo de Ca^{2+} , superando la translocasa y haciendo aleatoria la distribución de los aminofosfolípidos.

La segregación normal de PS y PE a la superficie interna de la membrana del plasma en este momento se acepta, por lo tanto, en general, y ciertos componentes de la membrana que participan en procesos asimétricos también han sido identificados. Sin embargo, quedan dudas acerca de las condiciones, mecanismos y tipos de células que son capaces de recolocar los aminofosfolípidos hacia la hoja externa de la membrana, y las implicaciones biológicas de estos eventos.

Informes contradictorios referentes a la expresión de los aminofosfolípidos no se limitan a los estudios de las plaquetas. La fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina generalmente son aproximadamente el 7 por ciento y aproximadamente el 10 por ciento, respectivamente, de la composición de fosfolípidos de células endoteliales humanas cultivadas a partir de arterias humanas, vena safena y umbilical (7, 1 por ciento y 10, 2 por ciento, respectivamente, Murphy y otros, 1992) . Sin embargo, un ejemplo importante de las contradicciones en la literatura se refiere a la capacidad de los anticuerpos anti-PS para enlazarse con células endoteliales (Lin y otros, 1995) .

Los anticuerpos anti-PS presentes en la pérdida recurrente de embarazo (Rote y otros, 1995; Rote, 1996; Vogt y otros, 1996; Vogt y otros, 1997) se cree que modulan la función celular endotelial, sin evidencia de enlazarse con células endoteliales. En un intento de explicar esta discrepancia, Lin y otros (1995) trataron, pero fallaron, de demostrar el enlace de anticuerpo anti-PS con las células endoteliales restantes. Los inventores concluyeron que los determinantes antigénicos de PS no se expresan en la superficie de las células endoteliales que quedan, aunque un determinante antigénico dependiente de PS se asoció con componentes parecidos a citoesqueléticos en células fijadas con acetona (Lin y otros, 1995) .

Van Heerde y otros (1994) informaron que las células endoteliales vasculares *in vitro* pueden catalizar la formación de trombina mediante la expresión de sitios de enlace, en los cuales se pueden ensamblar complejos procoagulantes. En comparación con otros estudios con plaquetas activadas (Bevens y otros, 1982; 1983; 1985; Maneta-Peyret y otros, 1989; Schick y otros, 1976; 1978) , las células endoteliales estimuladas con HUVEC no mostraron un aumento en los sitios de enlace de PS en comparación con las células quiescentes (Van Heerde y otros, 1994) . Se informó que la fosfatidilserina era necesaria para la formación del Factor Xa a través de la ruta extrínseca, así como la ruta intrínseca (Van Heerde y otros, 1994) . Sin embargo, Brinkman y otros (1994) publicaron resultados contradictorios, indicando que otros constituyentes de la membrana, además de los fosfolípidos cargados negativamente participan en la activación intrínseca, mediada por células endoteliales, del factor X.

Ravanat y otros (1992) también estudiaron el potencial catalítico de fosfolípidos en reacciones pro- y anti-coagulantes en sistemas purificados y en la superficie de células endoteliales en cultivos después de la estimulación. Sus resultados aparentemente contradictorios se propusieron para confirmar un papel de los mecanismos dependientes de los fosfolípidos, tanto en la actividad del Factor de Tejido procoagulante como en actividades anticoagulantes (la activación de la proteína C por el complejo trombina-trombomodulina y por el Factor Xa) (Ravanat y otros, 1992) . Los resultados de Ravanat y otros (1992) también se dice que proporcionan evidencia de la exposición de fosfolípidos durante la activación de las células endoteliales humanas, lo cual no había sido observado por Van Heerde y otros (1994) o por Brinkman y otros (1994) . Sin embargo, los inventores notaron que los fosfolípidos aniónicos tienen accesibilidad restringida en la vecindad del Factor de Tejido celular. La situación se complica más conforme, aún después de la inducción de Factor de Tejido, otros eventos son probablemente necesarios para la coagulación, ya que el Factor de Tejido permanece inaccesible, estando bajo la célula.

Ravanat y otros (1992) siguieron sugiriendo que la extensión diferente de inhibición del Factor de Tejido y las actividades de trombomodulina en células endoteliales estimuladas significa que los ambientes de cofactor difieren para la expresión óptima de estas actividades celulares opuestas. Sin embargo, las dificultades reconocidas para tratar de reproducir los ambientes de fosfolípidos celulares exactos (Ravanat y otros, 1992) presentaron la posibilidad de datos artificiales a partir de estos estudios *in vitro*. Sin embargo, independientemente de los datos de Ravanat y otros (1992) , generalmente se reconoce que información significativa con respecto a la biología de los tumores, y particularmente la intervención terapéutica, solamente se puede vislumbrar a partir de estudios *in vivo* en animales que tienen tumores, tales como aquellos conducidos por los presentes inventores.

Además de los desacuerdos con respecto a la expresión de aminofosfolípidos, como se discutió anteriormente, también hay informes contradictorios referentes a la función de los aminofosfolípidos en varios tipos celulares. Aunque en este momento generalmente se acepta que la expresión de PS en plaquetas activadas se relaciona con la superficie de procoagulantes, al comentar el significado fisiológico de la asimetría de fosfolípidos de membrana en las plaquetas y glóbulos rojos, Zwaal y otros (1989) resaltaron otras funciones importantes. Más aún, Toti y otros (1996) declararon que las implicaciones fisiológicas de una pérdida de distribución de fosfolípido asimétrica son poco entendidas en tipos celulares distintos de las células sanguíneas.

Zwaal y otros (1989) declararon que la asimetría de fosfolípidos de la membrana de las plaquetas y los glóbulos rojos no se deshace cuando las células son activadas de varias maneras, presumiblemente mediadas por el movimiento transbicapa aumentado de los fosfolípidos. Estos cambios, acoplados con la liberación de micropartículas vertidas, se explicó que representan un papel en las reacciones de coagulación de sangre locales. Se describió un fenómeno similar que se presenta en glóbulos rojos falciformes: las vesículas de fosfolípidos que se desprenden de las células reversiblemente falciformes contribuyen a la coagulación intravascular en la fase de crisis de la enfermedad de células falciformes (Zwaal y otros, 1989).

Tanto Zwaal y otros (1989) como Williamson y Schlegel (1994) han indicado que la importancia fisiológica de los cambios de fosfolípidos en superficie no se restringe a la homeostasis. De hecho, la exposición superficial de PS por las células sanguíneas se dijo que altera significativamente su reconocimiento por el sistema reticuloendotelial, y fue para representar como mínimo parte del mecanismo homeostático para la limpieza de células de sangre de la circulación (Zwaal y otros, 1989). Por lo tanto, la PS actúa como una señal para la eliminación de plaquetas activadas después de que el sangrado se ha detenido. El reconocimiento de PS expuesto en células falciformes y en las células infectadas con malaria por fagocitos y macrófagos explica sus efectos contrapatofisiológicos (Zwaal y otros, 1989). Además, la fagocitosis dependiente de PS marca las células infectadas viralmente para la asimilación fagocítica (Solicitud Internacional WO 97/17084). La expresión superficial de aminofosfolípidos podría también conferir competencia de fusión a una célula (Williamson y Schlegel, 1994).

Williamson y Schlegel (1994) también especularon que hay una razón de ser más general para la simetría de lípidos. Por ejemplo, aunque los diferentes grupos de cabeza reciben más atención, podría ser una asimetría de ácidos grasos el factor importante (Williamson y Schlegel, 1994). Otra hipótesis es que la distribución asimétrica de los fosfolípidos de transbicapa no tiene función en sí misma, sino que es el proceso dinámico del movimiento de lípidos lo que es importante para los sistemas biológicos (Williamson y Schlegel, 1994).

Muchos grupos han dado a conocer que las células de tumores son responsables de la actividad protrombinasa del tumor (Connor y otros, 1989; Rao y otros, 1992; Zacharski y otros, 1993; Sugimura y otros, 1994; Donati, 1995). Esto podría haberse razonado que es debido a PS (Solicitud Internacional WO 91/07187). Sin embargo, los resultados de Sugimura y otros (1994) argumentan contra esto: los inventores dieron a conocer que aunque tanto la actividad de protrombinasa como la actividad procoagulante total de las células tumorigénicas, HepG2 y MKN-28, caen en la confluencia de alcance, los niveles de PS permanecieron constantes.

En vez de soportar un papel para la PS de las células de tumores en la actividad de protrombinasa, Connor y otros (1989) sugirieron que la expresión aumentada de PS en células tumorigénicas es relevante a su capacidad para ser reconocidas y enlazadas por macrófagos. Utsugi y otros (1991) propusieron similarmente que la presencia de PS en la membrana externa de las células de tumores humanos explica su reconocimiento por los monocitos.

Jamasbi y otros (1994) sugirieron un papel totalmente diferente para los componentes lípidos en las células tumorigénicas, proponiendo que los lípidos interfirieron con la accesibilidad antigénica de los tumores. Por lo tanto, los lípidos de células de tumores actuarían para modificar los antígenos de la superficie de la célula del tumor, protegiendo, por lo tanto, a las células de los tumores de la destrucción inmune de la huésped (Jamasbi y otros, 1994). Esta hipótesis no es diferente de la propuesta por Qu y otros (1996), en términos de células endoteliales. Estos autores mostraron que las células T se adherían a células endoteliales umbilicales humanas tratadas con trombina, en virtud del enlace con la PS (Qu y otros, 1996).

Por lo tanto, se ha propuesto que la adhesión de células T mediadas por PS con células endoteliales *in vivo* es importante tanto para la vigilancia inmunológica, como para los procesos de enfermedad de la aterosclerosis (Qu y otros, 1996; Moldovan y otros, 1994). Bombeli y otros (1997) y Flynn y otros (1997) también sugirieron que las células dentro de placas ateroscleróticas pueden contribuir al avance de la enfermedad exponiendo PS, aunque esto se basa solamente en estudios *in vitro*. Qu y otros (1996) y Moldovan y otros, (1994) aún sugirieron un enfoque opuesto al de la presente invención, es decir, la manipulación de interacciones de fosfatidilserina como un enfoque anticoagulante. Las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.658.877 y 5.296.467 han propuesto la anexín (o anexina) para su uso como anti-endotoxinas y anti-coagulantes. La Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.632.986 sugiere el uso del ligando de enlace de fosfatidilserina, anexina V, como un conjugado con un componente, tal como uroquinasa, que provoca lisis en los trombos.

Toti y otros (1996) sugieren que el síndrome de Scott, un desorden de hemorragias heredado, puede reflejar la supresión o mutación de una translocasa de fosfatidilserina putativa hacia afuera o escramblasa. Aunque una noción interesante, Stout y otros (1997) aislaron después una proteína de membrana de los eritrocitos de Scott que

mostraban actividad escramblasa de PL normal cuando se reconstituyeron en vesículas con PLs exógenos. Se sugirió que el defecto en el síndrome de Scott se relaciona con una interacción alterada de Ca^{2+} con escramblasa PL sobre la superficie endofacial de la membrana celular, debido ya sea a una restricción intrínseca sobre la proteína, evitando la interacción con Ca^{2+} en el sitio, o debido a un inhibidor no identificado o cofactor en la célula de Scott que se disocia mediante detergente (Stout y otros, 1997) .

Se han dado a conocer resultados más variables en relación con el posible papel de la PS en la apoptosis. Williamson y Schlegel (1994) discutieron el tema de la PS como un marcador de muerte celular programada (PCD o apoptosis) . Se acepta generalmente que la muerte celular programada, como mínimo en el sistema hematopoyético, requiere el secuestro de fagocitos de las células apoptóticas antes de la pérdida de la integridad de la membrana o ruptura. La pérdida de la asimetría de la membrana en las células apoptóticas, y particularmente la aparición de PS en la hoja externa, fue propuesta como el disparador para su reconocimiento por los macrófagos fagocíticos (Williamson y Schlegel, 1994) .

Martin y otros (1995) informaron además sobre la externalización de PS como un evento precoz y disperso durante la apoptosis de una variedad de tipos celulares murinos y humanos, independientemente del estímulo de iniciación. Los inventores también indicaron que, bajo condiciones en las cuales las características morfológicas de apoptosis se evitan (inhibición de síntesis macromolecular, sobreexpresión de Bcl-2 o Abl) , la aparición de PS sobre la hoja externa de la membrana del plasma se evitó similarmente (Martin y otros, 1995) .

Sin embargo, otros análisis argumentan contra las propuestas de Williamson y Schlegel (1994) y Martin y otros (1995) en algún grado (Vermes y otros, 1995) . Aunque estos autores indican que la translocalización de la PS a la superficie de la membrana externa es un marcador de apoptosis, razonan que esto no es exclusivo para la apoptosis, sino que también se presenta durante la necrosis celular. La diferencia entre estas dos formas de muerte celular es que durante las etapas iniciales de la apoptosis, la membrana celular permanece intacta, mientras que en el mismo momento en que se presenta la necrosis, la membrana celular pierde su integridad y se vuelve escurridiza. Por lo tanto, de acuerdo con este razonamiento, la expresión de la PS en la superficie celular no indica apoptosis, a menos que el ensayo de exclusión por tinte se haya llevado a cabo para establecer la integridad de la membrana celular (Vermes y otros, 1995) .

Sin embargo, el cuerpo de la literatura anterior a la presente invención sí parece indicar que la aparición de la PS en la superficie externa de una célula identifica una célula apoptótica, y señala esa ingestión de la célula (Hampton y otros, 1996; Solicitud Internacional WO 95/27903) . Hampton y otros (1996) concluyeron que aunque una elevación en el Ca^{2+} intracelular fue un disparador ineficaz de la apoptosis de las células investigadas, se requirió Ca^{2+} extracelular para la exposición de PS eficiente durante la apoptosis. En cambio, la propuesta de Martin y otros (1995) de que la activación de una translocasa de PS adentro-afuera es un evento precoz de dispersión amplia durante la apoptosis, parecería requerir como mínimo algún Ca^{2+} intracelular (Zhou y otros, 1997; Zhao y otros, 1998) .

Blankenberg y otros (1998) muy recientemente dieron a conocer que la anexina V, una proteína humana endógena con una alta afinidad para PS, se puede usar para concentrar en sitios de muerte celular apoptótica *in vivo*. La anexina V radioetiquetada localizada en sitios de la apoptosis en tres modelos, incluyendo el rechazo aloinjerto cardíaco agudo (Blankenberg y otros, 1998) . El manchado de aloinjertos cardíacos para anexina V administrada exógenamente reveló miocitos en la periferia de los infiltrados mononucleares, de los cuales solamente algunos demostraron núcleos apoptóticos positivos.

Finalmente, el movimiento de la transbicapa de fosfolípidos en la membrana del plasma ha sido analizado en células de esperma de carnero, en donde la existencia de una segregación transversal de fosfolípidos ha sido implicada en el proceso de fertilización (Müller y otros, 1994) . La asimetría de fosfolípidos ha estado recibiendo, por lo tanto, atención creciente, aunque un entendimiento claro de este fenómeno, o su relación con la salud o la enfermedad, no se ha realizado.

Independientemente del estado de confusión de la técnica con respecto a la biología de los aminofosfolípidos, los presentes inventores descubrieron, en estudios controlados *in vivo*, que los aminofosfolípidos, tales como PS y PE, eran marcadores específicos de los vasos sanguíneos del tumor. Esto es sorprendente a la luz de los estudios anteriores de la función de los aminofosfolípidos, particularmente los que indican que la expresión en su superficie celular de la PS se acompaña por enlace de células circulantes, tales como células T (Qu y otros, 1996) , macrófagos (Connor y otros, 1989) , monocitos (Utsugi y otros, 1991) o fagocitos (Zwaal y otros, 1989; Williamson y Schlegel, 1994) , y es un marcador de células apoptóticas (Hampton y otros, 1996; Martin y otros, 1995; Zhou y otros, 1997; Zhao y otros, 1998) .

Por lo tanto, antes de esta invención, la posibilidad de usar aminofosfolípidos como marcadores dirigibles de cualquier enfermedad, en especial de la vasculatura de los tumores, sería muy poco probable que se contemplara, debido al enmascaramiento percibido de estas moléculas por el enlace de uno o más tipos de células o su expresión momentánea antes de la muerte apoptótica. De hecho, sugerencias especulativas tratan sobre la interrupción de las interacciones celulares-PS, tales como previniendo el enlace de leucocitos, un evento inicial en la aterosclerosis (Qu y otros, 1996) .

Otros aspectos sorprendentes de este descubrimiento son evidentes en una comparación con trabajos anteriores con respecto a quitar las micropartículas procoagulantes de las membranas del plasma y la demarcación de células para la fagocitosis (WO 97/17084) . Zwaal y otros (1989; 1992) y Dachar y -Prigent y otros (1996) explicaron que la translocalización de PS a la membrana del plasma se sigue por la liberación de micropartículas, microvesículas o microesferas a partir de las células. Zwaal y otros (1989) y Williamson y Schlegel (1994) indicaron que la expresión superficial de PS incita la limpieza mediante el sistema reticuloendotelial. A la luz de estos hechos de las células que expresan PS, y las distintas actividades de translocasa bicapa documentadas (Julien y otros, 1995; Zhou y otros, 1997; Zhao y otros, 1998) , es sorprendente que los aminofosfolípidos superficiales de las células, tales como la PS y la PE, puedan formar marcadores estáticos y suficientemente estables para permitir la localización y el enlace con anticuerpos.

Antes de la presente invención, había evidencia creciente de que la PS de superficie aparece como parte del proceso apoptótico, marcando células para su rápida destrucción (Hampton y otros, 1996; Martin y otros, 1995) . Por lo tanto, aunque razonable para su uso como un marcador de diagnóstico para ciertos estados de enfermedad, tales como rechazo de injertos (Blankenberg y otros, 1998) , la vida aparentemente limitada de la PS de superficie también aconsejaría en contra de su uso como un marcador viable para objetivo en la intervención terapéutica.

Sin embargo, el estudio presente sin duda descubrió que los aminofosfolípidos son marcadores de las células endoteliales vasculares del tumor adecuados para ser objetivos. Después de postular que la expresión de la PS era necesaria para la acción del coaguligando VCAM, la presencia de la PS sobre los vasos sanguíneos del tumor, pero no en los vasos normales, fue demostrada *in vivo*. Las observaciones *in vivo* permitieron a los inventores explicar la seguridad y efectividad de los coaguligandos anti-VCAM. Esto se debe al requisito de la expresión coincidente de un marcador dirigido (por ejemplo, VCAM) , y la PS en el endotelio del tumor. Aún si la molécula objetivo está presente sobre el endotelio en condiciones normales o patológicas, no se dará como resultado la trombosis si falta la expresión superficial de PS.

El valor de la presente invención no se limita a explicar la acción de coaguligando, ni al sorprendente desarrollo de las terapias de anticuerpos naturales. Estos descubrimientos han permitido a los inventores mostrar, por primera vez, que la translocalización de la PS en células endoteliales puede presentarse sin daño celular significativo o muerte celular (Ejemplo XIV) . En el modelo de los inventores, la translocalización de la PS a la superficie de las células endoteliales de los vasos sanguíneos del tumor se presenta, como mínimo en una parte significativa, independientemente de los mecanismos apoptóticos u otros mecanismos de muerte celular. Por lo tanto, la expresión en superficie de la PS en el ambiente del tumor no es una consecuencia de la muerte celular, ni tampoco dispara la destrucción celular inmediata. Esto es de fundamental importancia y representa un adelanto en el entendimiento científico de la biología de la PS, la translocalización de la membrana, y las trayectorias de señalización de células y apoptosis.

La separación de la translocalización de la PS de la célula endotelial a partir de la apoptosis (ejemplo XIV) también es integral a los métodos de la intervención terapéutica basada en la expresión en superficie de la PS. Si la translocalización de la PS a la membrana externa en las células endoteliales vasculares del tumor se presenta solamente en células que están muriendo, o si inevitablemente dispara la muerte celular, entonces el marcador PS probablemente no estaría suficientemente disponible para servir como una entidad objetivo para terapia efectiva (utilizando anticuerpos naturales o conjugados terapéuticos) . Esto no quiere decir que la expresión de la PS en ciertas células endoteliales vasculares del tumor no es transitoria, y que el trastorno y la muerte celular no se presentan en esta población de células endoteliales, sino que el descubrimiento de que se puede lograr la expresión de PS estable significativa sin muerte celular es un descubrimiento crucial importante en varios campos de la biología y para las nuevas terapias.

D. Anticuerpos desnudos contra aminofosfolípidos para tratamiento tumoral

Los presentes estudios de expresión de vasculatura tumoral con aminofosfolípidos soportan además la utilización de coaguligandos dirigidos contra marcadores conocidos de vasculatura tumoral como agentes trombóticos selectivos para el tratamiento de tumores sólidos. Las presentes observaciones han conducido también a los inventores a desarrollar otros métodos de tratamiento tumoral. Por ejemplo, la utilización de inmunotoxinas anti-aminofosfolípidos y coaguligandos anti-aminofosfolípidos en el tratamiento tumoral se da a conocer y se reivindica en la publicación PCT número WO-A-00/02587, que se incorpora específicamente a la actual a título de referencia. El sorprendente descubrimiento de la expresión estable de PS en células endoteliales intactas asociadas a tumores, que no están sometidas a muerte celular, hace que dichos métodos sean practicables y sorprendentes en sus efectos (dado que la expresión PS se creyó que estaba asociada solamente con la destrucción celular) .

No obstante, se han descubierto métodos todavía más inesperados de tratamiento tumoral. En la investigación de la utilización potencial de ataque mediante aminofosfolípidos, en el contexto de suministro posterior de una toxina o coagulante a la vasculatura del tumor, los inventores han descubierto de manera sorprendente que los anticuerpos desnudos anti-PS tienen un efecto destructivo en la vasculatura tumoral *in vivo*, en ausencia completa de cualquier fracción efectiva adicional.

Uno de los presentes inventores ha estado desarrollando inmunotoxinas y coagulandos contra la musculatura tumoral para utilización terapéutica durante algún tiempo (por ejemplo, ver las Patentes U.S.A. números 5.855.866; 5.877.289; 5.965.132; 6.004.555 y 6.093.399) . En el curso normal de estos estudios, se han administrado varios anticuerpos incluyendo anti-Clase II, anti-endoglina, anti-VCAM-1 y anti-VEGF, a animales portadores de tumores y han demostrado localizarse específicamente en la vasculatura intratumoral. Como continuación de esta confirmación, los anticuerpos están enlazados a la parte efectiva tóxica o coagulante para formar una inmunotoxina o coagulando, que es administrado posteriormente para ejercer un efecto anti-tumoral.

Durante estos estudios, no se han descubierto anticuerpos desnudos que ejerzan por sí mismos un efecto anti-tumoral. La capacidad de anticuerpos anti-aminofosfolípidos en localizarse específicamente en vasculatura tumoral y ejercer un efecto destructor concomitante, que lleva a la necrosis tumoral, es por lo tanto inesperada.

Si bien una comprensión molecular precisa de la forma exacta en la que funcionan los anticuerpos desnudos no es necesaria a efectos de practicar la presente invención, los inventores han previsto varios mecanismos que pueden ser la base de la destrucción celular endotelial observada. Los mecanismos preferentes comprenden citotoxicidad mediada por células, lisis mediada por complementos y/o apoptosis, si bien también pueden estar involucradas la señalización celular inducida por anticuerpos y/o alteraciones en el citoesqueleto.

Dado que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-aminofosfolípidos desnudos o no conjugados se unen a aminofosfolípidos en la superficie de las células endoteliales de los vasos del tumor, éstos formarán un recubrimiento anticuerpos sobre la superficie luminal. Esto puede funcionar para atraer células efectivas inmunes, tales como células T citotóxicas y/o células NK, que ejercerán entonces un efecto citotóxico mediado por células sobre las células endoteliales vasculares.

La unión de anticuerpos intactos anti-aminofosfolípidos a la superficie de células endoteliales vasculares significará también que las partes Fc de los anticuerpos sobresaldrán hacia adentro del lumen vascular. Dado que los fragmentos Fc del anticuerpo activan la ruta complementaria, la destrucción celular observada puede ser un resultado de lisis complementaria-dirigida. La unión de anticuerpos activa, por lo tanto, la cascada de coagulación dependiente de complementos provocando la unión de multicomponentes complejos y finalmente generando un complejo lítico que permeabiliza la célula objetivo. Por lo tanto, el ADCC activado por complementos puede funcionar también en la destrucción, en la que el complemento se une a la célula objetivo recubierta por anticuerpos, y en la que las células, tales como neutrófilos, que tienen receptores para complemento, provocan la lisis de la célula objetivo.

La unión de anticuerpos anti-aminofosfolípidos puede también inducir apoptosis en las células endoteliales vasculares del tumor. Otros grupos han identificado PS como un marcador posible de apoptosis (Williamson y Schlegel, 1994) . No obstante, estos estudios anteriores estaban relacionados con la aparición de PS externalizado después de que otros estímulos habían iniciado el evento apoptótico (Martin y otros, 1995) , es decir, lo inverso de la propuesta de inducción de apoptosis actual. No hay informaciones conocidas de que los anticuerpos se unan a PS induciendo realmente apoptosis. No obstante, los inventores consideran que esto es un mecanismo tan probable como la citotoxicidad mediada por células o la lisis mediada por complementos, a pesar del hecho de que se ha publicado muy recientemente la evidencia tangencial en sentido contrario por otros investigadores (Nakamura y otros, 1998) .

Nakamura y otros (1998) analizaron las fracciones de anticuerpos de pacientes con anticoagulante de lupus (LAC) , un desorden asociado con trombosis arterial y venosa, trombocitopenia, y pérdida fetal recurrente. El plasma con actividad anticoagulante de lupus inicialmente se dio a conocer que induce apoptosis en células endoteliales (Nakamura y otros, 1994) . Las actividades apoptóticas del antisuero anticoagulante de lupus se dio a conocer entonces que se localizaba en la fracción de anticuerpo de enlace con anexina V en 10/10 pacientes estudiados (Nakamura y otros, 1998) . Como la anexina se enlaza con PS, la capacidad aparente de los anticuerpos anti-anexina para inducir la apoptosis sería la opuesta de uno de los mecanismos destructivos dados a conocer por los presentes inventores, es decir, a la capacidad de un anticuerpo anti-PS para inducir apoptosis.

La capacidad de las fracciones de anticuerpo LAC para inducir apoptosis se dio a conocer adicionalmente que es inhibida por la preincubación con anexina V (Nakamura y otros, 1998) . En cambio, la eliminación de anticuerpos anti-fosfolípidos de las fracciones IgG de pacientes con liposomas de fosfolípidos no abolió las actividades que inducen la apoptosis o el enlace de anexina V (Nakamura y otros, 1998) . Estos resultados razonablemente implicaron que los pacientes con LAC frecuentemente tienen anticuerpos que no se enlazan con fosfolípidos y así son responsables de la inducción de apoptosis de células endoteliales (Nakamura y otros, 1998) .

Sin necesidad de igualar los datos de LAC de Nakamura y otros (1998) con las presentes observaciones a partir de estudios *in vivo* de tumores y vasculatura de tumor, debido a la naturaleza evidentemente dispar de estas condiciones clínicas, los presentes inventores, sin embargo, tienen ciertas teorías unificantes. Nakamura y otros (1998) intentaron eliminar anticuerpos de anti-fosfolípidos a partir de antisuero de pacientes usando liposomas de fosfolípidos, y observaron que esto no abolió la actividad que induce la apoptosis. Estos resultados condujeron a Nakamura y otros (1998) a concluir que los anticuerpos anti-fosfolípidos no pueden ser responsables de la actividad apoptótica. Sin embargo, los presentes inventores tienen el deseo de sugerir que la incubación con liposomas de

fosfolípidos puede no haber eliminado los anticuerpos anti-fosfolípidos del antisuero, ya que los fosfolípidos son antigénicamente neutrales en forma de dos capas y liposomal, y en gran medida sólo se enlazan con anticuerpos en forma hexagonal (Rauch y otros, 1986; Rauch y Janoff, 1990; Berard y otros, 1993; incorporada cada una a la presente invención como referencia) , o en asociación con proteínas de membrana. Por lo tanto, los anticuerpos de anti-fosfolípidos pueden permanecer en el antisuero LAC y pueden causar la actividad apoptótica observada o contribuir a la misma.

Se puede concebir también que la unión de anti-aminofosfolípidos a la superficie de las células endoteliales vasculares de tumores puede provocar alteraciones en la organización del citoesqueleto de la célula. Dado que el citoesqueleto juega un papel en la organización de las membranas superficiales, y dado que la unión anti-aminofosfolípido puede alterar (o alterar adicionalmente) la membrana, la unión de anticuerpos puede transmitir cambios a proteínas al citoesqueleto que interactúan con la bicapa. Es ya conocido que la organización espacial de las proteínas del citoesqueleto controlan la estabilidad de la membrana y la forma de las células, y es posible que la perturbación de equilibrio del citoesqueleto pueda tener consecuencias de alcance en cuanto a la integridad celular.

Otro mecanismo operativo adicional de la invención puede consistir en que la unión de anticuerpos anti-aminofosfolípido a la superficie de la célula endotelial puede iniciar transducción de señales por rutas que todavía no han sido definidas. La unión de anticuerpos anti-aminofosfolípidos puede también alterar rutas conocidas de transducción de señales, por ejemplo, por alteración de la conformación y/o interacciones de receptores de membranas, proteínas de transducción de señales, canales de membranas y similares. Las señales para destrucción celular (apoptosis) se pueden iniciar o imitar, y/o se pueden inhibir señales de preservación/homeostáticas.

Si bien es de interés científico, la determinación de la naturaleza exacta de la destrucción vascular conseguida por los anticuerpos desnudos anti-aminofosfolípidos no es necesaria para la práctica de la presente invención. Dado que la administración de anticuerpos anti-aminofosfolípidos se ha demostrado que resulta ventajosamente en efectos anti-tumorales específicos *in vivo*, la invención puede ser utilizada con independencia del mecanismo molecular que se subyace en este fenómeno.

Por lo tanto, la utilización de anticuerpos desnudos de la presente invención representa un adelanto significativo en la terapia tumoral. Si bien los coagulandos son ventajosos para terapia tumoral, el anticuerpo de ataque o ligando de ataque necesita ser conjugado a un coagulante efectivo, o estar asociado funcionalmente al mismo, tal como el Factor de Tejido. Por lo tanto, la práctica del ataque por coagulandos y la metodología de destrucción tumoral es algo laboriosa por el hecho de que requiere la preparación de conjugados adecuados, o complejos moleculares coordinados (incluyendo anticuerpos biespecíficos) . Por ejemplo, se debe preparar un anticuerpo o ligando de ataque que se une al antígeno objetivo deseado; escoger un coagulante apropiado; enlazar el coagulante al anticuerpo o ligando de ataque, o formar de otro modo una asociación funcional de los dos componentes para formar el coagulando; separar el coagulando del agente de ataque no conjugado, o sin formación de complejo, y coagulante; y a continuación realizar los protocolos del tratamiento.

Si bien los métodos basados en coagulandos se pueden llevar a la práctica de manera fácil y satisfactoria, se pueden apreciar las ventajas que resultan del presente desarrollo de metodología que incluye menos etapas preparatorias y que por lo tanto puede ser llevado a cabo de una manera más eficaz desde el punto de vista de los costes. Además, la presente invención da a conocer un sistema de un solo componente que avanzará de manera más rápida por el proceso de aprobación normativa, permitiendo que métodos de tratamiento mejorados puedan ser trasladados al ámbito clínico, en el que se necesitan de manera urgente.

E. Anticuerpos anti-aminofosfolípidos

E1. Anticuerpos de anti-aminofosfolípido policlonales

Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son muy conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, *Antibodies: A Laborator y Manual*, Cold Spring Harbor Laborator y , 1988; incorporado a la presente invención a título de referencia) . Para preparar antisueros policlonales un animal se inmuniza con una composición de aminofosfolípido inmunogénica, y los antisueros recolectados de ese animal inmunizado. Una amplia gama 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 sanguíneo relativamente grande de los conejos, un conejo es la elección preferente 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. Una variedad de rutas se pueden usar para administrar el presente inmunógeno de aminofosfolípido; subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal e intraesplénica. La producción de anticuerpos policlonales se puede controlar realizando muestras de 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 adecuada.

Cuando se obtiene un nivel de titulación deseado, el animal inmunizado se puede sangrar y el suero es aislado y almacenado. El animal también se puede usar para generar anticuerpos monoclonales.

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

10 Puede ser deseado reforzar el sistema inmunológico del huésped, lo que se puede lograr asociando los aminofosfolípidos con un portador o acoplado los aminofosfolípidos al mismo. Los portadores son, a título de ejemplo, hemocianina keyhole limpet (KLH) y albúmina de suero bovino (BSA). Otras albúminas, tales como la ovalbúmina, albúmina de suero de ratón o la albúmina de suero de conejo, también se pueden usar como portadores.

15 Como también se conoce en esta técnica, una composición dada puede variar en su inmunogenicidad. Sin embargo, la generación de anticuerpos contra los aminofosfolípidos no es particularmente difícil. Por ejemplo, los anticuerpos anti-fosfatidilserina muy específicos se cultivaron en conejos inmunizados con inyecciones intramusculares de geles de poli(acrilamida) que contienen fosfatidilserina y con vesículas de citocroma c de fosfatidilserina (Maneta-Peyret y otros, 1988; 1989 incorporadas a la presente invención como referencia). El uso de implantes de acrilamida aumentó la producción de anticuerpos (Maneta-Peyret y otros, 1988; 1989). Los anticuerpos anti-fosfatidilserina cultivados de esta manera son capaces de detectar la fosfatidilserina *in situ* en plaquetas humanas (Maneta-Peyret y otros, 1988). Los grupos de Inoue, Rote y Rauch también han desarrollado anticuerpos anti-PS y anti-PE (ver más adelante).

E2. Anticuerpos de anti-aminofosfolípidos monoclonales

25 Varios métodos para generar anticuerpos monoclonales (MAbs) también son muy conocidos en este momento en la técnica. Las técnicas de generación de anticuerpos monoclonales más estándares generalmente comienzan a lo largo de las mismas líneas que aquellas para preparar anticuerpos policlonales (Antibodies: A Laboratory and Manual, Cold Spring Harbor Laboratory y , 1988). Una respuesta de anticuerpo policlonal se inicia inmunizando un animal con una composición de aminofosfolípido inmunogénico y, cuando se obtiene un nivel de titulación deseado, el animal inmunizado se puede emplear para generar anticuerpos monoclonales.

30 Los anticuerpos monoclonales pueden ser fácilmente preparados a través del uso de técnicas muy conocidas, tales como las ejemplificadas en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 4.196.265 adjunta a la presente invención como referencia. Típicamente, esta técnica involucra inmunizar un animal adecuado con la composición de inmunógeno de aminofosfolípido seleccionada. La composición inmunizante se administra de una manera efectiva para estimular las células de producción de anticuerpos. Los roedores tales como ratones y ratas son los animales preferentes, 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), pero se prefieren los ratones, siendo el más preferente el ratón BALB/c y éste se usa de manera más rutinaria y generalmente da un porcentaje más alto de fusiones estables.

40 Después de la inmunización, las células somáticas con el potencial para producir anticuerpos de aminofosfolípidos, específicamente linfocitos B (células B), se seleccionan para su uso en el protocolo para generar anticuerpos monoclonales. Estas células se pueden obtener a partir de bazo, amígdalas o ganglios linfáticos procedentes de una biopsia, 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 habrán sido inmunizados y el bazo del animal con la titulación de anticuerpos más alta será eliminado y se obtendrán los linfocitos del bazo homogenizando el bazo con una jeringa. Típicamente, un bazo de un ratón inmunizado contiene aproximadamente 5×10^7 hasta 2×10^8 linfocitos.

45 Los linfocitos B que producen anticuerpos de anti-aminofosfolípidos a partir del animal inmunizado se fusionan entonces con células de una célula de mieloma inmortal, generalmente una de la misma especie que el animal que fue inmunizado. Las líneas de células de mieloma adecuadas para su uso en procedimientos de fusión que producen 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).

50 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, uno puede usar PE-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; para ratas, uno puede usar R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F, 4B210 o una de las líneas celulares de ratón listadas 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 o 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 desde aproximadamente 20:1 hasta aproximadamente 1:1, respectivamente, en la presencia de un agente o agentes (químicos o eléctricos) que promueven la fusión de las membranas celulares. Los métodos de fusión usando el virus Sendai se han descrito por Kohler y Milstein (1975; 1976) , y aquellos que usan polietilenglicol (PEG) , tal como 37 por ciento (volumen/volumen) de polietilenglicol, por Geffer y otros, (1977) . El uso de métodos de fusión inducidos eléctricamente también es adecuado (Goding páginas 71-74, 1986) .

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 padre 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 un agente que bloquea la síntesis *de novo* de los nucleótidos en el medio de cultivo de tejido. Los agentes a título de ejemplo y preferentes 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 suplementan con hipoxantina y timidina como una fuente de nucleótidos (medio HAT) . Cuando se usa azaserina, los medios se suplementan con hipoxantina.

El medio de selección preferente es HAT. Solamente las células capaces de activar trayectorias de salvación de nucleótidos son capaces de sobrevivir en el medio HAT. Las células de mieloma carecen de enzimas claves de la trayectoria de salvación, es decir, hipoxantina fosforribosil transferasa (HPR) , y no pueden sobrevivir. Las células B pueden activar esta trayectoria, 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 clon único en placas de microtitulación, seguidas por pruebas de los sobrenadantes clonales individuales (después de aproximadamente dos a tres semanas) para la reactividad de anti-aminofosfolípido deseada. La prueba podría ser sensible, simple y rápida, como los radioinmunoensayos, los inmunoensayos de enzimas, los ensayos de citotoxicidad, los ensayos de placa, los ensayos de inmunoenlace de punto, y similares.

Los hibridomas seleccionados se diluirían serialmente y clonarían en líneas celulares que producen anticuerpos de anti-aminofosfolípidos individuales, cuyos clones pueden propagarse indefinidamente para proporcionar anticuerpos monoclonales. Las líneas celulares se pueden explotar para la producción de anticuerpos monoclonales en dos maneras básicas. Una muestra de hibridoma se puede inyectar (frecuentemente 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 de ascitas, se pueden entonces drenar para proporcionar anticuerpos monoclonales a alta concentración. Las líneas celulares individuales podrían también ser cultivadas *in vitro*, en donde los anticuerpos monoclonales se secretan naturalmente en el medio de cultivo a partir del cual pueden obtenerse fácilmente en altas concentraciones.

Los anticuerpos monoclonales 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 adecuados para la preparación de anticuerpos incluyen, por ejemplo, cromatografía de proteína A-Sefarosa y/o proteína G-Sefarosa.

Umeda y otros, (1989) dieron a conocer la producción efectiva de anticuerpos monoclonales que reconocen epítopes estéreo-específicos de la fosfatidilserina. El sistema Umeda se basa en la inmunización directa de la fosfatidilserina en bazo de ratón usando una muestra de aminofosfolípido cubierto por *Salmonella* (Umeda y otros, 1989) . El protocolo de Umeda da una alta frecuencia de anticuerpos monoclonales anti-PS, que muestran tres perfiles distintos de reactividad variando desde altamente específico hasta ampliamente reactivo en cruz. Umeda por lo tanto también se incorpora en la presente solicitud de patente a título de referencia para describir adicionalmente los ensayos de selección para identificar los anticuerpos monoclonales que se enlazan específicamente con PS, por ejemplo, y no se enlazan con fosfatidilcolina.

Cualquiera de los 61 hibridomas generados por Umeda podrían potencialmente emplearse en la presente invención. Los ejemplos son PSC8, PSF11, PSG3, PSD11, PSF10, PS1B, PS3D12, PS2C11; PS3A, PSF6, PSF7, PSB4, PS3H1; PS4A7 y PS1G3. Los más preferentes son PS3A, PSF6, PSF7, PSB4 y PS3H1 ya que se enlazan solamente con la fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. Los anticuerpos anti-PS preferentes son PS4A7 (IgM) y PS1G3 (IgG₃) , ya que son muy específicos para PS y no muestran reacción cruzada con otros fosfolípidos. El PS4A7 reconoce la configuración estéreo-específica del residuo serina en PS (Figura 1, Umeda y otros, 1989) .

Igarashi y otros, (1991) también informaron sobre la inducción efectiva de anticuerpos anti-PS del isotipo IgG mediante inmunización intraesplénica. Solamente un ligero incremento de titulación se observó cuando se inyectó nuevamente intravenosamente el antígeno. Una frecuencia alta de anticuerpos monoclonales anti-PS del isotipo IgG también se observó incluso cuando se produjeron los anticuerpos monoclonales 10 días después de la inyección intraesplénica del antígeno. Estos anticuerpos también se emplearon por Schuurmans Stekhoven y otros, (1994) .

La otra producción de anticuerpo anti-PS significativa ha sido por Rote y colegas. Rote y otros, (1993) empleó particularmente micelas de PS en combinación con adyuvante completo de Freund para generar anticuerpos anti-PS específicos. Rote y otros, (1993) también generaron anticuerpos monoclonales que se diferencian entre cardioplipina (CL) y PS. Rote y otros, (1993) por lo tanto también se incorporan en la presente solicitud de patente a título de referencia con objetivo de describir adicionalmente ensayos de selección para identificar los anticuerpos monoclonales que se enlazan específicamente con PS probando contra plaquetas en reposo y activadas por trombina usando la citometría de flujo.

El anticuerpo 3SB9b producido por Rote y otros, (1993) reaccionó solamente con PS, y es un anticuerpo preferente para su uso en la presente invención. BA3B5C4 también se puede usar ya que reacciona tanto con PS como con CL. Esos anticuerpos también se describen en Lin y otros (1995) , Obringer y otros (1995) y Katsuragawa y otros (1997) .

E3. Anticuerpos anti-aminofosfolípidos a partir de bibliotecas de fagémidos

La tecnología recombinante permite en este momento la preparación de anticuerpos que tienen la especificidad deseada a partir de genes recombinantes que codifican una gama de anticuerpos (Van Dijk y otros, 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 otros, 1986; Winter y Milstein, 1991) .

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 y 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 generan 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 utiliza el bacteriófago lambda como el vector (Huse y otros, 1989) . La producción de anticuerpos que usan el vector lambda comprende la clonación de poblaciones de cadenas pesadas y ligeras de las secuencias de ADN en vectores iniciales por separado. Los vectores se combinan posteriormente 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 PCR o una técnica de amplificación relacionada, de ARNm aislado a partir de células de bazo (o hibridomas de las mismas) de un animal que ha sido 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 despliegue derivados de fago filamentoso, tal como M13, fil o fd. Estos vectores de despliegue de fago filamentoso, conocidos como fagémidos, producen grandes bibliotecas de anticuerpos monoclonales que tienen diversas y novedosas inmunoespecificidades. La tecnología usa un dominio de ancla de membrana de proteína de recubrimiento de fago filamentoso como un medio para enlazar el producto del gen y el gen durante la etapa de ensamble de la réplica de fago filamentoso, y se ha usado para la clonación y expresión de anticuerpos a partir de bibliotecas combinatorias (Kang y otros, 1991; Barbas y otros, 1991) .

Esta técnica general para el despliegue de fago filamentoso se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.658.727. En un sentido más general, el método proporciona un sistema para la clonación y selección simultánea de especificidades de enlace 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 de enlace de ligando preseleccionada permite la correlación de la capacidad de enlace de una molécula de anticuerpo expresada con un medio adecuado 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 ataque a un polipéptido de fusión en el periplasma de una célula bacteriana para permitir el ensamble de un anticuerpo funcional, y el ataque de un polipéptido de fusión sobre el recubrimiento de una partícula de fago filamentoso durante el ensamble del fago para permitir la selección adecuada del miembro de interés de la biblioteca. El ataque periplásmico se proporciona por la presencia de un dominio de señal de secreción en un polipéptido de fusión. Tomar como blanco o atacar una partícula de fago se proporciona mediante la presencia de un dominio de ancla de membrana de proteína de

recubrimiento de fago filamentosos (es decir, un dominio de ancla 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 mezclando genes de cadenas pesadas y ligeras, alterando una o más de las regiones de determinación de complementariedad de los genes de cadena pesada clonados de la biblioteca, o introduciendo mutaciones aleatorias en la biblioteca mediante reacciones de cadena de polimerasa propensa a error. Otros métodos adicionales para seleccionar bibliotecas de fagémidos se describen en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.580.717; 5.427.908; 5.403.484; y 5.223.409.

Otro método para la selección de grandes bibliotecas de anticuerpos combinatorios se ha desarrollado, utilizando la expresión de poblaciones de diversas secuencias de cadenas pesadas y ligeras en la superficie de un bacteriófago filamentosos, tal como M13, fl o fd (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.698.426) . Dos poblaciones de diversas secuencias de cadenas pesada (Hc) y ligera (Lc) se sintetizan por la reacción de cadena de polimerasa (PCR) . 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 de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.698.426) . 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 pseudo gVIII están contenidas solamente en 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 enlacen en un solo vector.

La expresión superficial de la biblioteca de anticuerpos se realiza en una cepa supresora de ámbar. Un codón de detención 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 enlazarán 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 enlazan con moléculas preseleccionadas mediante procedimientos de aislamiento por afinidad estándares. Estos métodos incluyen, por ejemplo, lavado con batea (Parmley y Smith, 1988 incorporada a la presente invención como referencia) , cromatografía por afinidad y procedimientos de manchado en fase sólida. El lavado con batea es preferente, 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 enlace deseables se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.667.988, y la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.759.817. El método comprende 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 despliegue se selecciona por su capacidad para enlazarse con un antígeno preseleccionado.

El método para producir una molécula de inmunoglobulina heterodimérica generalmente comprende (1) introducir un gen de codificación de región V de cadena pesada o ligera de interés en el vector de despliegue de fagémido; (2) introducir un sitio de enlace aleatorio en el vector de proteína de despliegue de fagémido por la extensión del cebador con un oligonucleótido que contiene regiones de homología con un CDR del gen de región V de anticuerpo y que contiene regiones de degeneración para producir secuencias de codificación aleatorias para formar una gran población de vectores de despliegue, cada uno capaz de expresar diferentes sitios de enlace putativos desplegados sobre una proteína de despliegue de superficie de fagémido; (3) expresar la proteína de despliegue y el sitio de enlace sobre la superficie de una partícula de fago filamentosos; y (4) aislar (seleccionar) la partícula de fago expresada en la superficie usando técnicas de afinidad, tales como lavado en batea de partículas de fago contra un antígeno previamente seleccionado, aislando una o más especies del fagémido que contiene una proteína de despliegue que contiene un sitio de enlace que enlaza un antígeno preseleccionado.

Otra variación de este método para producir diversas bibliotecas de anticuerpos y seleccionar especificidades de enlace deseables se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.702.892 incorporada a la presente invención como referencia. En este método, solamente se emplean secuencias de cadena pesada, las secuencias de cadena pesada son aleatorias en todas las posiciones del nucleótido, las cuales codifican ya sea la región hipervariable CDRI o CDRIII, y la variabilidad genética en las CDRs se genera independientemente de cualquier proceso biológico.

En el método, dos bibliotecas se diseñan técnicamente para cambiar genéticamente los motivos de oligonucleótidos dentro del marco estructural de la estructura del gen de cadena pesada. En toda la mutación aleatoria, ya sea de la CDRI o CDRIII, 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 poseen el potencial para tener todas las características de enlace 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 clones 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, cada una expresando una proteína recombinante diferente, se extienden, y los clones individuales se pueden probar para determinar su actividad de enlace.

E4. Anticuerpos anti-aminofosfolípidos a partir de pacientes humanos

Los anticuerpos contra los aminofosfolípidos, particularmente la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina, se presentan en la población humana, en donde se correlacionan con ciertos estados de enfermedades. Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos son parte de los anticuerpos anti-fosfolípido heterogéneos (aPL), observados que tienen familias de diferentes especificidades y clases. El síndrome anti-fosfolípido primario (APS) se ha separado de otras formas de enfermedad autoinmune asociada con la producción de anticuerpos anti-fosfolípidos.

Los anticuerpos anti-PS se asocian particularmente con pérdida de embarazo recurrente (Rote y otros, 1995; Rote, 1996; Vogt y otros, 1996; Vogt y otros, 1997) y con la enfermedad autoinmune, lupus eritematoso sistémico (SLE o lupus) (Branch y otros, 1987). Los anticuerpos anti-PE también se han dado a conocer en pacientes humanos, particularmente aquellos con enfermedades autoinmunes (Staub y otros, 1989). Branch y otros (1987) dieron a conocer que el 80 por ciento de pacientes con lupus anticoagulante (LA o LAC) tenían autoanticuerpos que reconocieron la PE; con Drouvalakis y Buchanan (1998) aumentando este número a 95 por ciento de positivos a PE a partir de suero de LAC autoinmune.

Los anticuerpos anti-fosfolípidos no se deben confundir con los anticuerpos anti-células endoteliales (AECA), aunque se pueden encontrar en el mismo paciente. La existencia de los AECA se ha documentado en una variedad de escenarios clínicos asociados con vasculitis, tales como esclerosis sistémica (SS). Para estudiar los anticuerpos anti-células endoteliales, se obtienen anticuerpos a partir de pacientes que no tienen anticuerpos anti-fosfolípidos (suero negativo-aPL).

El papel patógeno de los anticuerpos anti-células endoteliales sigue siendo poco claro, aunque Bordron y otros (1998) muy recientemente sugirieron que los anticuerpos anti-células endoteliales pueden iniciar la apoptosis en las células endoteliales, lo cual sería seguido por transferencia de PS a la cara externa de la membrana. Los inventores propusieron que esto serviría para la generación posterior de los anticuerpos anti-fosfolípidos que algunas veces se ven junto con los anticuerpos anti-células endoteliales en pacientes con lesiones de la piel o con enfermedad de tejido conectivo (Bordron y otros, 1998). Sin embargo, aunque los anticuerpos anti-células endoteliales que se enlazan con el antígeno que induce la apoptosis se postuló, estos estudios no condujeron a mayor caracterización de los anticuerpos anti-células endoteliales, todavía expresan que representan una familia extremadamente heterogénea de anticuerpos que reaccionan con diferentes estructuras (no lípidos) en las células endoteliales (Bordron y otros, 1998).

Los anticuerpos anti-fosfatidilserina están muy asociados con pérdida de embarazo, hipertensión inducida en el embarazo y retardo de crecimiento intrauterino. Un antígeno dependiente de la fosfatidilserina se ha mostrado que se expresa en la superficie de un modelo de coriocarcinoma (BeWo) de células citotrofoblásticas de diferenciación, lo que indica que debería ser accesible *in vivo* a los anticuerpos anti-fosfatidilserina circulantes (Rote y otros, 1995). Sin duda, Vogt y otros (1996) mostraron que el anticuerpo monoclonal 3SB9b, que reacciona con fosfatidilserina pero no con cardiolipina, indujo una reducción significativa tanto en los pesos fetales y placentarios en un modelo de ratón para el síndrome de anticuerpo anti-fosfolípido.

Estos autores desarrollaron un modelo para explicar los abortos asociados con anticuerpos anti-fosfolípidos: el anticuerpo anti-fosfatidilserina revela sitios para el enlace de protrombina en la superficie del trofoblasto, más probablemente eliminando Anexina V (Vogt y otros, 1997). La diferenciación del trofoblasto se asocia con la externalización de la fosfatidilserina a partir de la superficie interna a la externa de la membrana del plasma. Normalmente, la externalización de la fosfatidilserina es concurrente con el enlace de Anexina V, lo cual evita que la

superficie rica en fosfatidilserina actúe como un sitio para la activación de la coagulación. Por lo tanto, cuando los anticuerpos anti-fosfolípidos están presentes, evitan el enlace de Anexina V y conducen a un estado procoagulante (Vogt y otros, 1997) .

- 5 Los anticuerpos anti-PE frecuentemente se asocian con anticoagulantes de lupus (sueros LAC) . El papel de la PE y anti-PE en la LAC es extremadamente complejo, ver, por ejemplo, Smirnov y otros (1995) , en donde se presentan varias hipótesis. Smirnov y otros (1995) dan a conocer que, en presencia de la proteína activada C y PE, el plasma de LAC forma coágulos más rápido que el plasma normal. Rauch y otros (1986) caracterizan los anticuerpos anti-fosfolípidos de LAC como que prolongan el tiempo de coagulación en ensayos de coagulación *in vitro*.
- 10 Vlachoyiannopoulos y otros (1993) probaron el suero SLE y APS mediante ensayo ELISA para anticuerpos para fosfatidiletanolamina y cardiolipina, en comparación con donantes de sangre sanos. Tanto los pacientes de SLE como de APS dieron a conocer que presentaban una titulación alta de anticuerpos anti-PE IgM que los pacientes normales, mientras que la reactividad de IgG e IgA anti-PE no difería. Se sugirió que los anticuerpos IgA e IgG anti-PE pueden presentarse en titulaciones bajas como autoanticuerpos naturales en sujetos normales (Vlachoyiannopoulos y otros (1993) .
- 15 Rauch y otros (1986) produjeron hibridomas fusionando linfocitos a partir de 13 pacientes con lupus eritematoso sistémico con una línea de linfoblastoide. Los inventores demostraron que los autoanticuerpos que prolongaban el tiempo de coagulación se enlazaban con fosfolípidos en fase hexagonal, incluyendo formas naturales y sintéticas de fosfatidiletanolamina (Rauch y otros, 1986, incorporada a la presente invención como referencia) . En cambio, los fosfolípidos laminares, tales como la fosfatidilcolina y las formas laminares sintéticas de la fosfatidiletanolamina, no tuvieron efecto en la actividad anticoagulante (Rauch y otros, 1986) .
- 20 Rauch y Janoff (1990) quisieron mostrar que la inmunización de ratones con fosfatidiletanolamina en la fase hexagonal II, pero no en la fase de bicapa, daba como resultado la inducción de anticuerpos anti-fosfolípidos. Estos anticuerpos fueron muy reactivos con la fosfatidiletanolamina y tuvieron actividad anticoagulante de lupus funcional característica de los autoanticuerpos de pacientes con enfermedad autoinmune (Rauch y Janoff, 1990) .
- 25 La forma de fase hexagonal II de los aminofosfolípidos deberá entonces usarse ventajosamente para generar anticuerpos para su uso en la presente invención. Sin duda, Trudell dio a conocer que los anticuerpos cultivados contra los aductos de proteína TFA- (trifluoroacetil-) se enlazan con TFA-fosfatidiletanolamina en las micelas de fosfolípido en fase hexagonal, pero no en liposomas laminares (Trudell y otros, 1991a) . Los autores sugieren que los aductos de TFA-fosfatidiletanolamina que residen en dominios no laminares en la superficie del hepatocito podrían ser sitios de reconocimiento para anticuerpos de aducto anti-TFA, y potencialmente participar en la hepatotoxicidad de halotano mediada inmune (Trudell y otros, 1991a) . Después se demostró que estos mismos anticuerpos reaccionan en forma cruzada con TFA-dioleoilfosfatidiletanolamina cuando este aducto se incorpora en la superficie de los hepatocitos (Trudell y otros, 1991b) , soportando, por lo tanto, esta hipótesis.
- 30 Berard además explicó la forma en fase hexagonal II de los aminofosfolípidos, tales como PE (Berard y otros, 1993) . En las bicapas, los fosfolípidos generalmente adoptan una estructura de gel, redícula cristalina o fase laminar (Berard y otros, 1993) . Sin embargo, dependiendo del contenido de colesterol, de los ambientes de proteína e iónicos, los fosfolípidos fácilmente cambian fases, adoptando una fase hexagonal II (Berard y otros, 1993) . Es esta fase hexagonal II de los aminofosfolípidos la que se cree que es inmunogénica, como se propuso inicialmente para la generación de autoanticuerpos en situaciones de enfermedad (Berard y otros, 1993) .
- 35 Qamar y otros (1990) han desarrollado una variación del tema de reconocimiento de aminofosfolípidos hexagonales. Usando la fosfatidiletanolamina como un modelo, estos autores dieron a conocer que los anticuerpos anti-PE a partir de suero SLE positivo para aPL no se enlaza con PE, pero de hecho se dirigen a la lisofosfatidiletanolamina (IPE) , un producto de degradación de PE natural y un probable contaminante de la mayoría de las preparaciones de PE (Qamar y otros, 1990) .
- 40 Otros datos recientes indican que la mayoría de los anticuerpos anti-fosfolípidos reconocen el fosfolípido en el contexto de las proteínas cercanas (Rote, 1996; Chamley y otros, 1991) . En membranas de plasma, la mayoría del fosfolípido parece estar naturalmente en una forma bilaminar no antigénica (Rote, 1996) . Las moléculas accesorias pueden ayudar a facilitar la transición a formas antigénicas hexagonales y estabilizar su expresión (Galli y otros, 1993) . Por ejemplo, los anticuerpos anti-fosfolípidos que se presentan naturalmente se dieron a conocer primeramente para reconocer complejos de cardiolipina o fosfatidilserina con β_2 - glicoproteína I (β_2 - GPI o apolipoproteína H, apoH) (Galli y otros, 1990; 1993) . Se cree que β_2 - GPI estabiliza los fosfolípidos en conformaciones antigénicas que no existen en los fosfolípidos puros (McNeil y otros, 1990; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.344.758; Chamley y otros, 1991; Matsuura y otros, 1994) . La protrombina también ha estado implicada en el proceso de estabilización de fosfolípidos (Bever y otros, 1991) .
- 45 Las proteínas de plasma que se enlazan con fosfolípidos también son generalmente necesarias para el reconocimiento de anticuerpos del fosfolípido eléctricamente neutro o zwitteriónico, fosfatidiletanolamina. Sugi y McIntyre (1995) identificaron dos proteínas de plasma de enlace con PE prominentes como kininógeno de alto peso molecular (HMWK o HK) , y kininógeno de bajo peso molecular (LMWK o LK) . Los anticuerpos anti-PE de pacientes

con SLE y/o abortos espontáneos recurrentes se mostró que no reconocen PE, HMWK o LMWK cuando fueron presentados independientemente como antígenos únicos en placas de ensayo ELISA (Sugi y McIntyre, 1995) . Otros sueros positivos anti-PE que no reaccionaron con PE-HMWK o PE-LMWK se sugirió que reconocen el factor XI o precalicreína, la cual normalmente se enlaza con HMWK (Sugi y McIntyre, 1995) .

5 La validez de estos resultados fue confirmada mostrando que la HMWK intacta se enlaza con varios fosfolípidos, tales como cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina; pero que los anticuerpos anti-PE reconocen solamente un complejo kininógeno-PE, y no reconocen quinínogenos presentados con otros sustratos de fosfolípidos (Sugi y McIntyre; 1996a) . Esto indica que PE induce cambios de conformación antigénicos únicos en los quinínogenos que no son inducidos cuando los quinínogenos enlazan con otros fosfolípidos (Sugi y McIntyre, 1996a)

10 .
Se ha demostrado además que los quinínogenos pueden enlazarse con las plaquetas en virtud de la PE expuesta en la membrana de la plaqueta (Sugi y McIntyre, 1996b) . Se mostró que anti-PE dependiente de quinínógeno añadido exógenamente aumenta la agregación de plaquetas inducida por trombina *in vitro*, pero no altera la agregación inducida de ADP (Sugi y McIntyre, 1996b) . En cambio, anti-PE independiente de kininógeno, que reconoce a PE *per se*, se dio a conocer que no aumenta la agregación de plaquetas inducida por trombina. Por lo tanto, se propuso que el anti-PE dependiente de kininógeno puede interrumpir los efectos anti-trombóticos normales del kininógeno (Sugi y McIntyre, 1996b) .

15 Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos de pacientes humanos por lo tanto son una mezcla de anticuerpos que generalmente reconocen los aminofosfolípidos estabilizados por interacciones de proteína (Rote, 1996) . Los anticuerpos se pueden enlazar con epítopes de fosfolípido estabilizados, o se pueden enlazar con un epítope formado a partir de la interacción del fosfolípido y los aminoácidos en la proteína estabilizante (Rote, 1996) . De cualquier modo, estos anticuerpos claramente reconocen los aminofosfolípidos en membranas naturales en el cuerpo humano, probablemente asociadas con proteínas del plasma (McNeil y otros, 1990; Bevers y otros, 1991) . Estos anticuerpos serían adecuados como materiales iniciales para generar un anticuerpo para su uso en la presente invención.

20 Para preparar un anticuerpo anti-aminofosfolípido a partir de un paciente humano, simplemente se obtendrían linfocitos humanos a partir de un individuo que tenga anticuerpos anti-aminofosfolípidos, por ejemplo, a partir de la sangre periférica humana, el bazo, los ganglios linfáticos, las amígdalas o similares, utilizando técnicas que son muy conocidas para los expertos en la técnica. El uso de linfocitos de la sangre periférica frecuentemente se prefiere.

30 Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden obtener a partir de los linfocitos humanos que producen los anticuerpos anti-aminofosfolípidos deseados inmortalizando los linfocitos humanos, generalmente de la misma manera que se describe anteriormente para generar cualquier anticuerpo monoclonal. Las reactividades de los anticuerpos en los sobrenadantes de los cultivos generalmente se verifican primero, empleando uno o más antígenos de aminofosfolípido seleccionados, y los linfocitos que muestran alta reactividad se cultivan. Los linfocitos resultantes se fusionan con una línea padre de origen humano o de ratón, y mayor selección proporciona los clones óptimos.

35 La recuperación de los anticuerpos monoclonales a partir de las células inmortalizadas se puede lograr mediante cualquier método generalmente empleado en la producción de anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal deseado se puede obtener clonando el linfocito inmortalizado mediante el método de dilución limitante o similar, seleccionando la célula que produce el anticuerpo deseado, cultivando las células seleccionadas en un medio o en la cavidad abdominal de un animal, y recuperando el anticuerpo monoclonal deseado a partir del sobrenadante del cultivo o ascites.

40 Esas técnicas se han usado, por ejemplo, para aislar anticuerpos monoclonales humanos para epítopes de *Pseudomonas aeruginosa* (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.196.337 y 5.252.480) ; polisacáridos capsulares de fosfato de polirribosilribitol (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4.954.449) ; antígeno Rh (D) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.665.356) ; y virus, tales como el virus de inmunodeficiencia humana, el virus sincitial respiratorio, virus de herpes símples, virus de varicela zóster y citomegalovirus (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.652.138; 5.762.905 y 4.950.595) .

45 La aplicabilidad de las técnicas anteriores para la generación de anticuerpos anti-aminofosfolípidos humanos es clara. Rauch y otros (1986) generalmente utilizaron estos métodos para producir hibridomas fusionando los linfocitos de pacientes de SLE con una línea de linfoblastoide. Esto produjo anticuerpos humanos que se enlazan con fosfolípidos en fase hexagonal, incluyendo formas naturales y sintéticas de la fosfatidiletanolamina (Rauch y otros 1986) .

50 Adicionalmente, los métodos descritos en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.648.077 se pueden usar para formar un trioma o un cuadro que produce un anticuerpo humano contra un aminofosfolípido seleccionado. En un sentido general, una línea celular de hibridoma que comprende una célula inmortalizante de roedor padre, tal como una célula de mieloma murino, por ejemplo, SP-2, se fusiona con una célula asociada

humana, dando como resultado una célula de hibridoma xenogénico inmortalizante. Esta célula de hibridoma xenogénico se fusiona con una célula capaz de producir un anticuerpo humano anti-aminofosfolípido, dando como resultado una línea de célula de trioma capaz de generar anticuerpo humano efectivo contra ese antígeno en un humano. Alternativamente, cuando se desea mucha estabilidad, se hace una línea celular de trioma, la cual preferiblemente ya no tiene la capacidad de producir su propio anticuerpo, y este trioma se fusiona entonces con otra célula capaz de producir un anticuerpo útil contra el antígeno de aminofosfolípido para obtener un hibridoma todavía más estable (cuadroma) que produce anticuerpo contra el antígeno.

E5. Anticuerpos anti-aminofosfolípidos a partir de linfocitos humanos

La inmunización *in vitro*, o la estimulación de antígeno, también se puede usar para generar un anticuerpo anti-aminofosfolípido humano. Estas técnicas se pueden usar para estimular los linfocitos de sangre periférica, tanto de pacientes humanos que producen anticuerpos anti-aminofosfolípidos, y también de sujetos sanos, normales. Sin duda, Vlachoyiannopoulos y otros (1993) dieron a conocer que anticuerpos anti-aminofosfolípidos de baja titulación se presentan en sujetos normales. Aun si esto no fuera el caso, los anticuerpos anti-aminofosfolípidos se pueden preparar a partir de sujetos humanos sanos, simplemente estimulando las células que producen anticuerpos con aminofosfolípidos *in vitro*.

Esta inmunización *in vitro* comprende 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 linfoquinas. Los anticuerpos producidos por estos métodos frecuentemente son anticuerpos IgM (Borrebaeck y otros, 1986) .

Otro método se ha descrito (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.681.729) , en donde los linfocitos humanos que principalmente producen anticuerpos IgG (o IgA) se pueden obtener. El método comprende, en un sentido general, trasplantar linfocitos humanos a un animal inmunodeficiente, de manera que los linfocitos humanos se implantan en el cuerpo del animal; inmunizar el animal con un antígeno deseado, de manera que genere linfocitos humanos que produzcan un anticuerpo específico al antígeno; y recuperar los linfocitos humanos produciendo el anticuerpo a partir del animal. Los linfocitos humanos producidos de este modo se pueden usar 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 recuperar un anticuerpo monoclonal específico al antígeno deseado a partir de los linfocitos originados humanos inmortalizados clonados.

Los animales inmunodeficientes que se pueden emplear 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.

La toma de los linfocitos humanos trasplantados en los animales se puede alcanzar únicamente administrando los linfocitos humanos a los animales. La ruta de administración no se restringe y puede ser, por ejemplo, subcutánea, intravenosa o intraperitoneal. La dosis de linfocitos humanos no se restringe, y usualmente puede ser 10^6 hasta 10^8 linfocitos por animal. El animal inmunodeficiente se inmuniza entonces con el antígeno de aminofosfolípido 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 a 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 aminofosfolípidos seleccionados. Los anticuerpos monoclonales se obtienen entonces a partir de linfocitos humanos mediante inmortalización, selección, crecimiento celular y producción de anticuerpos.

E6. Ratones transgénicos que contienen bibliotecas de anticuerpos humanos

La tecnología recombinante en este momento 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 de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.545.807.

En un sentido más general, estos métodos comprenden la producción de un animal transgénico que ha insertado en su línea germinal material genético que codifica para como mínimo parte de una inmunoglobulina de origen humano, o que puede rediseñar 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 como

5 mínimo parte de una inmunoglobulina conocida, o puede modificarse para codificar como mínimo parte de una inmunoglobulina alterada.

El material genético insertado se expresa en el animal transgénico, dando como resultado la producción de una inmunoglobulina derivada como mínimo en parte del material genético de inmunoglobulina humana insertado. Es sabido que el material genético se reacomoda en el animal transgénico, de manera que un repertorio de

10 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 procarióticos, tales como plásmidos y/o cósmidos. Los fragmentos de ADN más grandes se insertan usando vectores de cromosoma artificial de levadura (Burke y otros, 1987), o mediante la introducción de fragmentos de cromosomas (Richer y Lo, 1989). El

15 material genético insertado se puede introducir en el huésped de manera convencional, por ejemplo, mediante inyección u otros procedimientos en huevos fertilizados o en células de tallo embrionario.

En aspectos preferentes, se utiliza un animal huésped que inicialmente no lleva el material genético que codifica regiones constantes de inmunoglobulina, de manera que el animal transgénico resultante usará solamente el material genético humano insertado cuando produce inmunoglobulinas. Esto se puede lograr ya sea usando un

20 huésped mutante que se presente naturalmente, que carece del material genético relevante, o haciendo artificialmente mutantes, por ejemplo, en líneas celulares finalmente para crear un hospedante, a partir del cual 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

25 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 adecuado, 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

30 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 eliminar del animal para producir la inmunoglobulina de interés. Preferiblemente, se producen anticuerpos monoclonales a partir del animal transgénico, por ejemplo, fusionando

35 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

40 leche, calostro o saliva. Por ejemplo, insertando material genético *in vitro* que codifica como mínimo 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

45 mamífero hembra adulto que produce leche que contiene inmunoglobulina derivada como mínimo en parte del material genético de inmunoglobulina humana insertada. El anticuerpo deseado se puede cosechar a partir de la leche. Las técnicas adecuadas 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

50 IgD. Otro método preferente para producir anticuerpos anti-aminofosfolípido humanos se describe en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 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 enlace determinada por las regiones productivamente redispuestas 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 μ o δ 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 épsilon) solamente se expresan originalmente después de que el evento de redistribución del gen borra los exones mu C y delta C. Este proceso de redistribución de genes, denominado cambio de isotipo, típicamente se presenta por la recombinación entre los llamados segmentos de cambio localizados inmediatamente más arriba de 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 más 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 de flanqueo 5' (es decir, más 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 enlazar operativamente a una región de cambio diferente para la formación del transgén, en algunas realizaciones se prefiere que cada región de cambio incorporada en la formación de transgén tenga una región de flanqueo 5' que se presenta inmediatamente más arriba en la configuración de línea germinal que se presenta naturalmente. La información de secuencia relacionada con las secuencias de regiones de cambio de inmunoglobulina es conocida (Mills y otros, 1990; Sideras y otros, 1989) .

En el método descrito en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 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 trayectoria del desarrollo de célula 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 y expresión específica de tipo de célula, (2) redistribución de gen funcional, (3) activación y respuesta a la exclusión alélica, (4) expresión de un repertorio primario suficiente, (5) transducción de señal, (6) hipermutación somática, y (7) dominio del lugar de anticuerpo de transgén durante la respuesta inmune.

Un requisito importante para la función de transgén es la generación de un repertorio de anticuerpos primario que sea suficientemente diverso para disparar una segunda respuesta inmune para una gama amplia de antígenos. El gen de cadena pesada redispuesto consiste en un exón de péptido de señal, un exón de región variable y una disposición en línea de regiones constantes de dominios múltiples, cada una de las cuales se codifica por 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 constantes proximales a la región V se borran conduciendo a 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 lugar de cadena pesada humano 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 lugar entero se extiende aproximadamente 2, 5 Mb de la porción distal del brazo largo del cromosoma 14. Son conocidos los fragmentos de transgén de cadena pesada que contienen miembros del total 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 (Berman y otros 1988) . Los fragmentos genómicos que contienen todos los segmentos de gen necesarios y las secuencias reguladoras a partir de un lugar de cadena ligera humana se construyen similarmente.

La expresión de transgenes pesados y ligeros de inmunoglobulina redispuestos con éxito usualmente tiene un efecto dominante suprimiendo la redistribución 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 lugares 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 célula de tallo embrionario y recombinación homóloga, el repertorio de inmunoglobulinas endógenas se puede eliminar fácilmente. Además, la supresión de los genes de inmunoglobulina 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 trans-cambiada. Los anticuerpos que comprenden estas inmunoglobulinas trans-cambiadas 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 la 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, ADCC) , de manera que este anticuerpo quimérico se puede probar en un modelo de enfermedad de ratón. Después de probar el animal, la secuencia de codificación de la región variable humana se puede aislar, por ejemplo, mediante amplificación de PCR (reacción de cadena de polimerasa) o clonación de ADNc a partir de la fuente (clon de hibridoma) , y separar en una secuencia que codifica una región constante humana deseada para codificar un anticuerpo de secuencia humana más adecuado para uso terapéutico humano.

E7. Anticuerpos anti-aminofosfolípidos humanizados

Los anticuerpos humanos generalmente tienen como mínimo 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 objetivo más eficientemente por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) . Segundo, el sistema inmune humano no deberá reconocer el anticuerpo como extraño. Tercero, la vida media en la circulación humana será similar a los anticuerpos humanos que se producen naturalmente, permitiendo que se den dosis más pequeñas y menos frecuentes.

Varios métodos para preparar anti-aminofosfolípidos humanos se dan a conocer en la presente patente. 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 anti-aminofosfolípido 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 totalmente extraño. Tercero, los anticuerpos humanizados inyectados, en oposición con los anticuerpos de ratón inyectados, presumiblemente tendrán una vida media más similar a los anticuerpos humanos que se presentan naturalmente, permitiendo también dosis más pequeñas y menos frecuentes.

Se han descrito varios métodos para producir anticuerpos humanizados. La redistribución controlada de dominios de anticuerpos unidos a través de enlaces de disulfuro de proteínas para formar moléculas de proteínas nuevas, artificiales, o anticuerpos quiméricos, se puede utilizar (Koniczny y otros, 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 ligeras y pesadas de anticuerpos humanos (Morrison y otros, 1984) .

Las secuencias de ADN que codifican las porciones de enlace de antígeno o las regiones de determinación de complementariedad (CDR) de los anticuerpos monoclonales murinos se pueden injertar mediante medios moleculares en las secuencias de ADN que codifican las estructuras de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos humanos (Jones y otros 1986; Riechmann y otros, 1988) . Los productos recombinantes expresados se denominan anticuerpos humanizados o reformados, y comprenden la estructura 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 de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.639.641. El método proporciona, a través de renovar 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) alineaciones de posiciones de un depósito de regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos se generan para dar un conjunto de posiciones expuestas de superficie de estructura de región variable de cadena pesada y ligera, en donde las posiciones de alineación para todas las regiones variables son como mínimo 98 por ciento aproximadamente idénticas; (2) un conjunto de residuos de aminoácidos expuestos en superficie de estructura de región variable de cadena pesada y ligera se define para un anticuerpo de roedor (o fragmento del mismo) ; (3) se identifica un conjunto de residuos de aminoácidos expuestos en superficie de la estructura de la región variable de cadena pesada y ligera que es casi idéntica al conjunto de residuos de aminoácidos expuestos en superficie del roedor; (4) el conjunto de residuos 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 residuos de aminoácidos expuestos en superficie de la estructura de la región variable de cadena pesada y ligera identificada en la etapa (3) , excepto para los residuos de aminoácidos que están dentro de $5\text{ring}\{A\}$ de cualquier átomo de cualquier residuo en las regiones de determinación complementarias del anticuerpo de roedor; y (5) se produce el anticuerpo de roedor humanizado que tiene especificidad de enlace.

Un método similar para la producción de anticuerpos humanizados se describe en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089 y 5.530.101. Estos métodos comprenden producir inmunoglobulinas humanizadas que tienen una o más regiones de determinación de complementariedad (CDR) y aminoácidos adicionales posibles a partir de una inmunoglobulina de donador y una región de estructura a partir de una inmunoglobulina humana de aceptación. Cada cadena de inmunoglobulina humanizada usualmente comprende, además de la CDR, aminoácidos de la estructura de inmunoglobulina de donador que son capaces de interactuar con las RCD para efectuar afinidad de enlace, tales como uno o más aminoácidos que están inmediatamente adyacentes a una CDR en la inmunoglobulina donadora o aquéllas dentro de aproximadamente $3\text{ring}\{A\}$ pronosticadas 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 de los Estados Unidos de Norteamérica Números 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 humanos y retienen sustancialmente la misma afinidad que la inmunoglobulina donadora al antígeno original.

Un método adicional para producir anticuerpos humanizados se describe en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 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 descripción. En un sentido general, el método utiliza secuencias del sitio de enlace de antígenos de un anticuerpo o población de anticuerpos dirigidos contra un antígeno de interés. Por lo tanto para un solo anticuerpo de roedor, las secuencias que comprenden parte del sitio de enlace del antígeno del anticuerpo se pueden combinar con diversos repertorios de secuencias de anticuerpos humanos que pueden, en combinación, crear un sitio de enlace de antígeno completo.

Los sitios de enlace de 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 contacto 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 enlace 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 enlace de antígeno, probablemente conduzcan a nuevos contactos de las secuencias humanas con la misma región o epítipo del antígeno. Este proceso se ha denominado por lo tanto selección impresa de epítipo (EIS).

Iniciando con un anticuerpo animal, un proceso da resultado en la selección de anticuerpos que son parcialmente anticuerpos 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 residuos clave. Las diferencias de secuencia entre el componente roedor del anticuerpo seleccionado con las secuencias humanas podrían minimizarse reemplazando aquellos residuos que difieren con los residuos de secuencias humanas, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio de residuos individuales, o por injerto en CDR de ciclos enteros. Sin embargo, los anticuerpos con secuencias enteramente humanas también se pueden crear. La EIS por lo tanto ofrece un método para hacer anticuerpos parcialmente humanos o enteramente humanos que se enlazan al mismo epítipo que los anticuerpos animales o parcialmente humanos, respectivamente. En la EIS, 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 enlace de antígenos seleccionados por el enlace del fago al antígeno.

Métodos adicionales para humanizar anticuerpos contemplados para su uso en la presente invención se describen en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 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.

E8. 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 adecuados para su uso en mutagénesis, el uso de la reacción de cadena de 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 describe en particular 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 adecuadas 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 la PCR, a los fragmentos amplificados se les achata el extremo por tratamiento con fragmentos de Klenow, y los fragmentos con extremo achatado se ligan y subclonan en un vector para facilitar el análisis de la secuencia.

Para preparar el ADN en plantilla 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 en plantillas se prepara usando una minipreparación de plásmido. Los cebadores de oligonucleótidos adecuados que se basan en la secuencia padre, 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 en plantilla por aproximadamente 15 bases o similar. Los cebadores se pueden purificar mediante electroforesis de gel de poliacrilamida desnaturizante, aunque esto no es absolutamente necesario para su uso en la PCR. El extremo 5' de los oligonucleótidos deberán entonces ser fosforilados.

El ADN en plantilla deberá ser amplificado por PCR, usando los cebadores de oligonucleótidos que contienen las mutaciones puntuales deseadas. La concentración de $MgCl_2$ en el regulador de amplificación generalmente será de aproximadamente 15 mM. Generalmente aproximadamente 20-25 ciclos de PCR deberán llevarse a cabo del modo siguiente: desnaturalización, 35 segundos a 95°C; hibridación, 2 minutos a 50°C; y extensión, 2 minutos a 72°C. La

5 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 es adecuada para clonación de extremo romo.

10 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 predecido. 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. A continuación, se digeriría aproximadamente la mitad de los fragmentos amplificados con una enzima de restricción que corta en las secuencias de flanqueo usadas en los oligonucleótidos. Los fragmentos digeridos se purifican en un gel de agarosa de baja gelificación/fusión.

15 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 subsecuentemente podría prepararse usando una minipreparación. La porción amplificada del ADN de plásmido se analizaría entonces mediante secuenciado 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.

20 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 recuecen entre sí y se extienden mediante síntesis cebadora mutua. Este fragmento se amplifica luego mediante una segunda etapa de PCR, evitando mediante esto la ligación de extremo romo requerida en el protocolo anterior. En este método, la preparación del ADN en plantilla, la generación de los cebadores de oligonucleótidos y la primera amplificación de PCR se realizan como se describió anteriormente. Sin embargo, en este proceso los oligonucleótidos elegidos deberán ser homólogos al ADN de plantilla para un tramo de aproximadamente entre 15 y 20 bases, y deberán también solaparse entre sí en aproximadamente 10 bases o más.

25 En la segunda amplificación por PCR, se usaría cada fragmento amplificado y cada cebador de secuencia de flanqueo y llevaría PCR durante aproximadamente 20 y aproximadamente 25 ciclos, usando las condiciones que se describieron anteriormente. Nuevamente se subclonarían los fragmentos y se verificaría que la mutación puntual fue correcta usando las etapas indicadas anteriormente.

30 Al usar cualquiera de los métodos anteriores, se prefiere generalmente introducir la mutación amplificando un fragmento tan pequeño como sea posible. Desde luego, los 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, serán conocidas para los expertos en la técnica, y se describirán adicionalmente en distintas publicaciones, tales como *Current Protocols in Molecular Biology, 1995*, incorporadas a la presente invención como referencia.

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

TABLA A

Aminoácidos		Codones							
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU					
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU					
Ácido 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					

E9. Expresión y suministro recombinantes

5 Dado que se dispone de muchos métodos para el clonado de anticuerpos, los anticuerpos anti-aminofosfolípidos pueden ser preparados por métodos rutinarios de expresión recombinante. El término constructo de expresión está destinado a incluir cualquier tipo de constructo genético que contiene un ácido nucleico que codifica para un producto de gen en el que una parte o la totalidad de la secuencia que codifica el ácido nucleico es capaz de ser transcrita. La parte transcrita será trasladada en general a una proteína. De este modo, tal como se pretende, la expresión preferentemente comprende tanto transcripción de gen de anticuerpo anti-aminofosfolípido o DNA como traslación del mRNA en un producto de proteína de anticuerpo anti-aminofosfolípido.

15 Para la expresión de un anticuerpo anti-aminofosfolípido, una vez que se ha obtenido un clon o clones adecuados, tanto si se basan en cDNA o genómicos, se puede proceder a preparar un sistema de expresión o constructo para producción de anticuerpos recombinantes. El diseño de un segmento o segmentos de DNA para expresión en un sistema procariótico o eucariótico se llevará a cabo por técnicas conocidas de manera general para los técnicos en la expresión de anticuerpos recombinantes (Sambrook y otros, 1989) . A efectos de que el constructo efectúe la expresión de un transcrito de anticuerpo anti-aminofosfolípido, el polinucleótido que codifica el anticuerpo se encontrará preferentemente bajo el control transcripcional de un promotor que promueve la expresión en las células oscilantes escogidas.

20 Los anticuerpos producidos de forma recombinante pueden ser purificados y formulados para administración humana. De manera alternativa, los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-aminofosfolípidos se pueden suministrar vía terapia de genes. Si bien se pueden utilizar DNA recombinante desnudo o plásmidos, la utilización de liposomas o vectores es preferente. La capacidad de ciertos virus de entrar en las células con intermedio de endocitosis mediada por receptor y para integrarse en el genoma de la célula hospedante y expresar genes víricos de forma estable y eficaz, los hacen candidatos atractivos para la transferencia de genes extraños en células de mamíferos. Los vectores de terapia de genes preferente a utilizar en la presente invención será en general la de vectores víricos.

Los retrovirus son prometedores como vectores de suministro génico debido a su capacidad de integrar sus genes en el genoma hospedante, transfiriendo una gran cantidad de material genético extraño, infectando un amplio espectro de especies y tipos de células y de empaquetarse en líneas celulares especiales. Otros virus, tales como adenovirus, virus de herpes simplex (HSV), citomegalovirus (CMV), y virus adeno-asociados (AAV), tales como los que se describen en la Patente U.S.A. 5.139.941, pueden ser también diseñados para servir como vectores para transferencia de genes.

Si bien algunos virus que pueden aceptar material genético extraño están limitados en cuanto al número de nucleótidos que pueden recibir y en la gama de células que infectan, estos virus se ha demostrado que efectúan de manera satisfactoria expresión de genes. No obstante, los adenovirus no integran su material genético en el genoma hospedante y por lo tanto no requieren replicación hospedante para expresión de genes, haciéndolos adecuados de manera ideal para expresión heteróloga de genes eficaz y rápida. Las técnicas para preparar virus infecciosos de replicación defectiva son bien conocidos en esta técnica.

En otras realizaciones adicionales, el vector de terapia genética será HSV. Un factor que hace el HSV un vector atractivo es la dimensión y organización del genoma. Dado que HSV es grande, la incorporación de múltiples genes o casetes de expresión es menos problemática que en otros sistemas víricos más pequeños. Además, la disponibilidad de diferentes secuencias de control vírico con comportamiento variable (por ejemplo, temporal, concentración) hace posible controlar la expresión en una medida mayor que en otros sistemas. También es una ventaja el que el virus tenga relativamente pocos mensajes cortados, facilitando adicionalmente las manipulaciones genéticas. El HSV es también relativamente fácil de manipular y puede ser cultivado en concentraciones elevadas.

Desde luego, en la utilización de sistemas de suministro vírico se deseará purificar el virión suficientemente para hacerlo esencialmente libre de contaminantes no deseables, tales como partículas víricas con interferencia defectiva o endotoxinas y otros pirógenos de manera tal que no provocará reacciones desfavorables en la célula, animal o individuo que reciba el constructo del vector. Un medio preferente de purificar el vector comporta la utilización de gradientes de densidad de flotación, tal como centrifugación de gradiente de cloruro de cesio.

E10. Fragmentos de anticuerpos

Independientemente de la fuente del anticuerpo anti-aminofosfolípido original, en la presente invención se puede utilizar cualquier anticuerpo intacto, multímeros del anticuerpo, o cualquiera de una variedad de regiones de enlace de antígeno funcionales del anticuerpo. Las regiones funcionales, a título de ejemplo, incluyen fragmentos scFv, Fv, Fab', Fab y F (ab')₂ de los anticuerpos anti-aminofosfolípidos. Las técnicas para preparar estas formaciones son muy conocidas para los expertos en la técnica y se ejemplifican adicionalmente en la presente descripción.

La elección de formación de anticuerpo puede estar influenciada por varios factores. Por ejemplo, la vida media 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 muestren aclaramiento de sangre más reducido que sus contrapartes Fab'. Sin embargo, las composiciones basadas en fragmentos Fab' generalmente mostrarán una capacidad mejor de penetración de tejido.

Los fragmentos Fab se pueden obtener mediante la proteólisis de la inmunoglobulina entera mediante la tiol proteasa no específica, papaína. La papaína primero se debe activar reduciendo el grupo sulfhidrilo en el sitio activo con cisteína, 2-mercaptoetanol o ditioneitol. Los metales pesados en la enzima de material podrían eliminarse mediante quelación con EDTA (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 separarse las distintas fracciones 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 regulador de acetato con pH 4, 5, 37°C, sugieren que el anticuerpo se disocia en el lado del terminal C del enlace disulfuro de la cadena interpesada. Las proporciones de digestión de la IgG de ratón pueden variar con la subclase y puede ser difícil obtener producciones altas de fragmentos F (ab')₂ activos sin alguna IgG sin digerir o completamente degradada. En particular, IgG_{2b} es muy 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.

La digestión de IgG de rata por pepsina requiere condiciones que incluyen diálisis en 0, 1 M de regulador de acetato, pH 4, 5, y luego incubación durante cuatro horas con 1 por ciento peso/peso de pepsina; la digestión de IgG₁ e IgG_{2a} se mejora si primero se dializa contra 0, 1 M de regulador de formato, pH 2, 8, a 4°C, durante 16 horas seguido de regulador de acetato. IgG_{2b} da resultados más consistentes con la incubación en proteasa V8 de estafilococos (3 por ciento peso/peso) en 0, 1 M de regulador de fosfato de sodio, pH 7, 8, durante cuatro horas a 37°C.

Las siguientes patentes y solicitudes de patentes se incorporan específicamente a la presente invención como referencia con el fin de incluso suplementar adicionalmente los presentes conocimientos con respecto a la

preparación y uso de regiones de enlace de antígeno, funcionales, de anticuerpos, incluyendo los fragmentos scFv, Fv, Fab', Fab y F (ab')₂ de los anticuerpos anti-aminofosfolípidos: Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica números 5.855.866; 5.965.132; 6.004.555; 6.093.399 y 5.877.289.

F. Composiciones farmacéuticas

- 5 Las composiciones farmacéuticas más básicas de la presente invención generalmente comprenderán una cantidad efectiva de como mínimo un primer anticuerpo anti-aminofosfolípido desnudo o un fragmento de enlace a antígeno del mismo, disuelto o disperso en un portador farmacéuticamente aceptable o medio acuoso. También se contemplan agentes terapéuticos combinados, y el mismo tipo de composiciones farmacéuticas subyacentes se puede emplear tanto para medicamentos solos como combinados.
- 10 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. Como se usa en la presente descripción, portador farmacéuticamente aceptable incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antihongos, agentes retardadores isotónicos y de absorción y similares. El uso de estos medios y agentes para agentes activos farmacéuticos es muy conocido en la técnica. Excepto que algún medio convencional o agente sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. 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 suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.
- 15
- 20 F1. Formulaciones parenterales
- Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos de la presente invención frecuentemente se formularán para la administración parenteral, por ejemplo, formuladas para inyección a través de las rutas intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, u otras rutas, 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 anti-aminofosfolípido como un ingrediente activo será conocido 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; también se pueden preparar las formas sólidas adecuadas para su uso para preparar soluciones o suspensiones después de la adición de un líquido antes de la inyección; y también se pueden emulsificar las preparaciones.
- 25
- 30 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones; formulaciones que incluyen aceite de ajonjolí, aceite de cacahuete 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 bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y deberá preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.
- 35
- Las composiciones de anticuerpo anti-aminofosfolípido se pueden formular en una composición acuosa estéril en una forma neutra o de sal. Las soluciones de los anticuerpos anti-aminofosfolípidos como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua convenientemente mezclada con un tensoactivo, 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.
- 40
- 45 Los portadores adecuados incluyen solventes y medios de dispersión que contienen, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares) , mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, 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 en el caso de dispersión y/o por el uso de tensoactivos.
- 50 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 varios agentes antibacterianos y antihongos, 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 agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- 55 Antes o después de la formulación, los anticuerpos anti-aminofosfolípidos deberán dializarse extensamente para eliminar moléculas de peso molecular reducido indeseables, y/o liofilizar para la formulación más fácil en el vehículo deseado, cuando sea apropiado. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los anticuerpos anti-aminofosfolípidos activos 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.

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

10 Las composiciones farmacéuticas adecuadas de acuerdo con la invención generalmente incluirán una cantidad de la formación del anticuerpo anti-aminofosfolípido mezclado con un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como solución acuosa estéril, para dar una gama de concentraciones finales, dependiendo del uso de destino. Las técnicas de preparación generalmente son muy conocidas en la técnica como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed. Mack Publishing Company, 1980. Deberá apreciarse que la contaminación por endotoxinas deberá mantenerse mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, menor de 0,5 ng/mg de proteína. Más aún, para la administración humana, la preparación deberá satisfacer esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y estándares de pureza como se requiere por la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

15 Después de la formulación, las soluciones de anticuerpos anti-aminofosfolípidos se administrarán de una manera compatible con la formulación de la dosis en una cantidad tal que sea efectiva terapéuticamente. 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, tabletas, píldoras, cápsulas u otros sólidos para administración oral, supositorios, pesarios, soluciones nasales o rociadores, aerosoles, inhalantes, formas liposomales y similares. También se pueden usar cápsulas o composiciones farmacéuticas de liberación lenta. 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 anticuerpos anti-aminofosfolípidos de acuerdo con la presente invención.

25 F2. Liposomas y nanocápsulas

En ciertas realizaciones, también se pueden emplear liposomas y/o nanopartículas con los anticuerpos anti-aminofosfolípidos. La formación y uso de los liposomas son generalmente conocidos para los expertos en la técnica, como se resume más adelante.

30 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 denominada vesículas de láminas múltiples (MLV)). Las MLV generalmente tienen diámetros de desde 25 nm hasta 4 µm. La sonicación de las MLV da como resultado la formación de vesículas de una sola lámina pequeñas (SUV) con diámetros en la gama de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo.

35 Los fosfolípidos pueden formar una variedad de estructuras distintas de liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la proporción molar de lípido al agua. En proporciones bajas, el liposoma es la estructura preferente. 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 compacta, conocida como estado de gel, a una estructura menos ordenada, compacta 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.

45 Los liposomas interactúan con células a través de cuatro mecanismos diferentes: endocitosis por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial 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 del liposoma en la membrana del plasma, 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 se puede alterar que mecanismo es operativo, aunque más de uno puede operar al mismo tiempo.

55 Las nanocápsulas generalmente pueden atrapar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos laterales debido a la sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (con tamaños de aproximadamente 0,1 micras) deberán diseñarse usando polímeros capaces de ser degradados *in vivo*. Las nanopartículas polialquil-cianoacrilato biodegradables que satisfacen estos requisitos se contemplan para su uso en la presente invención y estas partículas se pueden fabricar fácilmente.

G. Equipos terapéuticos

Se dan a conocer también equipos (kits) terapéuticos que comprenden anticuerpos anti-aminofosfolípidos para su uso en los presentes métodos de tratamiento. Estos equipos generalmente contendrán, en elementos contenedores adecuados, una formulación farmacéuticamente aceptable de como mínimo un anticuerpo anti-aminofosfolípido. Por ejemplo, estos equipos pueden contener cualquiera de uno o más de una gama de fármacos quimioterapéuticos o radioterapéuticos; agentes anti-angiogénicos; anticuerpos de células anti-tumor; y/o inmunotoxinas o coagulandos de vasculatura anti-tumor o estroma anti-tumor.

Los equipos pueden tener un solo contenedor (medio de contenedor) que contiene el anticuerpo anti-aminofosfolípido, con o sin componentes adicionales, o pueden tener distintos contenedores para cada agente deseado. Cuando se proporcionan 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, cada uno de los anticuerpos anti-aminofosfolípidos y otros componentes de agentes anticáncer del equipo se pueden mantener por separado dentro de contenedores distintos antes de la administración a un paciente.

Cuando los componentes del equipo se proporcionan en una o más soluciones líquidas, la solución líquida preferiblemente es una solución acuosa, siendo particularmente preferente la solución acuosa estéril. Sin embargo, los componentes del equipo 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 adecuado. Se considera que el solvente también puede proporcionarse en otro contenedor.

Los contenedores del equipo generalmente incluyen como mínimo un frasco, tubo de prueba, matraz, botella, jeringa u otro elemento contenedor, en el cual el anticuerpo anti-aminofosfolípido, y cualquier otro agente deseado, se puede colocar y, preferiblemente, convenientemente fraccionar. Cuando se incluyen componentes separados, el equipo también contendrá generalmente un segundo frasco u otro contenedor en el cual éstos se colocan, permitiendo la administración de dosis diseñadas por separado. Los equipos también pueden contener un segundo/tercer elemento contenedor para contener un regulador farmacéuticamente aceptable, estéril, u otro diluyente.

Los equipos también pueden contener un elemento mediante el cual se administra el anticuerpo anti-aminofosfolípido a un animal o paciente, por ejemplo, una o más agujas o jeringas, o hasta un gotero, 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 equipos de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener los frascos, o cualquier otro componente, en confinamiento cerrado para venta comercial, tal como, por ejemplo, contenedores de plástico moldeados por soplado o por inyección en los cuales se colocan y retienen los frascos y otros aparatos deseados.

H. Tratamiento de tumores

El uso más importante de la presente invención está en el tratamiento de tumores malignos, vascularizados; también se contempla con el tratamiento de tumores benignos, tales como la BPH (hipertrofia prostática benigna) . La invención también se puede usar en la terapia de otras enfermedades y desórdenes que tienen, como un componente de la enfermedad, vasos sanguíneos protrombóticos. Estas enfermedades asociadas con la vasculatura incluyen retinopatía diabética, degeneración macular, restenosis vascular, que incluye restenosis después de la angioplastia, malformaciones arteriovenosas (AVM) , meningioma, hemangioma, glaucoma neovascular y psoriasis; y también angiofibroma, artritis, artritis reumatoide, placas ateroscleróticas, neovascularización de injerto córneo, uniones hemofílicas, heridas hipertróficas, síndrome de osler-weber, fibroplasia retrolental de granulama piogénico, esclerodermos, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, otras varias enfermedades y desórdenes inflamatorios, e incluso endometriosis.

El tratamiento del anticuerpo anti-aminofosfolípido de la invención se explota más preferentemente para el tratamiento de tumores sólidos. Estos usos pueden emplear anticuerpos anti-aminofosfolípidos solos o en combinación con agentes quimioterapéuticos, radioterapéuticos, apoptóticos, anti-angiogénicos y/o inmunotoxinas o coagulandos. Los métodos de anticuerpo anti-aminofosfolípido son ampliamente aplicables al tratamiento de cualquier tumor maligno que tiene un componente vascular. Los tumores típicamente vascularizados son los tumores sólidos, particularmente los carcinomas, los cuales requieren un componente vascular para la disposición de oxígeno y nutrientes. Los tumores sólidos que, a título de ejemplo, se pueden tratar usando la invención incluyen, pero sin limitación, carcinomas del pulmón, pecho, ovario, estómago, páncreas, laringe, esófago, testículos, hígado, parótidas, vías biliares, colon, recto, cervix, útero, endometrio, riñón, vejiga, próstata, tiroides, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de células pequeñas, melanomas, gliomas, neuroblastomas, y similares.

La presente invención se contempla para su uso en el tratamiento de cualquier paciente que presente un tumor sólido. Sin embargo, en lo que la invención es particularmente exitosa es en el tratamiento de tumores sólidos de tamaños moderados o grandes, los pacientes en estas categorías probablemente recibirán beneficios más significativos del tratamiento de acuerdo con los métodos y composiciones proporcionados en la presente descripción.

5 Por lo tanto, en general, la invención se puede usar para tratar tumores de aproximadamente 0, 3-0, 5 centímetros y superiores, aunque tiene un uso mejor de la invención para tratar tumores mayores de 0, 5 centímetros de tamaño. A partir de estudios ya conducidos en modelos animales aceptables, se cree que los pacientes que presentan tumores de entre aproximadamente 1, 0 y aproximadamente 2, 0 centímetros de tamaño estarán en el grupo de tratamiento preferente de pacientes para terapia de anticuerpo anti-aminofosfolípido, aunque los tumores hasta dicha dimensión e incluyendo los tumores más grandes encontrados en humanos también se pueden tratar.

10 Aunque la presente invención no se destina generalmente como tratamiento preventivo o profiláctico, el uso de la misma básicamente no se limita al tratamiento de pacientes que tienen tumores solamente de tamaños moderados o grandes. Existen muchas razones por debajo de este aspecto de la amplitud de la invención. Por ejemplo, un paciente que presenta un tumor primario de tamaño moderado o grande también puede tener otros varios tumores metastásicos que se consideran que son de tamaño pequeño o aun en etapas tempranas de extensión de tumor metastático. Dado que los anticuerpos anti-aminofosfolípidos o combinaciones de la invención generalmente se administran en la circulación sistémica de un paciente, naturalmente tendrán efectos sobre los tumores secundarios, más pequeños y metastáticos, aunque esto no puede ser la intención principal del tratamiento. Además, aún en situaciones en las que la masa del tumor como un todo es un solo tumor pequeño, ciertos efectos anti-tumor benéficos serán resultado del uso del presente tratamiento de anticuerpo anti-aminofosfolípido.

20 La guía proporcionada en la presente descripción con respecto a los pacientes más adecuados para su uso en relación con la presente invención tiene como objetivo el conocimiento de que ciertos perfiles de pacientes pueden ayudar en la selección de pacientes para el tratamiento de la presente invención La pre-selección 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 un tumor vascularizado. Una consideración adicional es el hecho de que el asalto sobre el tumor proporcionado por la terapia de anticuerpo anti-aminofosfolípido 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 incluso conduce a la remisión o cura total.

25 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 agentes terapéuticos secundarios, particularmente quimioterapéuticos y las inmunotoxinas celulares anti-tumor. Dado que el efecto de la presente terapia es destruir la vasculatura del tumor, y la vasculatura es sustancial o enteramente la misma en todos los tumores sólidos, se entenderá que la presente metodología de anti-aminofosfolípido es amplia o enteramente aplicable al tratamiento de todos los tumores sólidos, independientemente del fenotipo particular o genotipo de las mismas células del tumor. Los datos presentados en esta invención son convincentes puesto que muestran notables resultados en un modelo de tumor que es resistente a la necrosis.

30 Las dosis terapéuticamente efectivas de los anticuerpos anti-aminofosfolípidos se pueden determinar fácilmente usando datos de un modelo animal, como se muestra en los estudios detallados en la presente descripción. Los animales experimentales que tienen tumores sólidos frecuentemente se usan para optimizar las dosis terapéuticas adecuadas antes de trasladarlas a un ambiente clínico. Se sabe que estos modelos son muy fiables para predecir estrategias anticáncer eficaces. Por ejemplo, los tumores sólidos que tienen 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 gamas de trabajo de los anticuerpos anti-aminofosfolípidos desnudos que producen efectos anti-tumor benéficos con toxicidad mínima.

40 Como se sabe en la técnica, éstos son objetivos realistas que se pueden usar como pautas en relación con las pruebas preclínicas antes de proceder al tratamiento clínico. Sin embargo, debido a la seguridad demostrada en modelos aceptados, las pruebas preclínicas de la presente invención serán más un asunto de optimización, en vez de para confirmar la efectividad. Por lo tanto las pruebas preclínicas se pueden emplear para seleccionar los anticuerpos anti-aminofosfolípidos más ventajosos, dosis o combinaciones.

45 Cualquier dosis de anticuerpo anti-aminofosfolípido, o medicamento combinado, que dé como resultado cualquier destrucción de vasculatura de tumor detectable consistente, trombosis y efectos anti-tumor, definirá todavía una invención útil. Los efectos destructivos, trombóticos y necróticos deberán observarse entre aproximadamente el 10 por ciento y aproximadamente el 40-50 por ciento de los vasos sanguíneos del tumor y tejidos del tumor, hasta aproximadamente entre 50 por ciento y aproximadamente 99 por ciento de estos efectos. La presente invención también puede ser efectiva contra los vasos de más abajo del tumor, es decir, dirigirse como mínimo a un subconjunto de los vasos de drenaje, particularmente como las citoquinas liberadas del tumor estarán actuando sobre estos vasos, cambiando su perfil antigénico.

55 Se entenderá también que aún en las circunstancias en donde los efectos anti-tumor de la dosis de anticuerpo anti-aminofosfolípido, o terapia combinada, están hacia los extremos inferiores de esta gama, puede ser que esta terapia todavía sea igual o aún más efectiva que otras terapias conocidas en el contexto de los objetivos del tumor particular. Desafortunadamente, es evidente para un clínico que ciertos tumores no se pueden tratar efectivamente en plazo intermedio o a largo plazo, pero no se niega la utilidad de la presente terapia, particularmente cuando es como mínimo tan efectiva como las otras estrategias generalmente propuestas.

Para diseñar dosis adecuadas de anticuerpos anti-aminofosfolípidos, o terapias combinadas, para el tratamiento de tumores vascularizados, se puede extrapolar fácilmente de estudios animales descritos en la presente descripción 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 tomarían 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 satisfactoria de 20 µg anticuerpo por ratón (peso corporal total de aproximadamente 20 g) , y aplicar cálculos estándares basados en la masa y área superficial, las dosis efectivas para su uso en pacientes humanos varían entre 1 miligramo y 500 miligramos aproximadamente de anticuerpo por paciente, y preferiblemente, entre 10 miligramos y 100 miligramos aproximadamente de anticuerpo por paciente. Además de todos los parámetros clínicos y terapéuticos variables, esta variación representa también que los datos de necrosis tumoral presentes son generados utilizando un modelo de tumor que es resistente a la necrosis, y en el que se ha observado menos teñido de vasos tumorales que en otros modelos.

De acuerdo con lo anterior, usando esta información, los inventores prevén que las dosis bajas útiles de anticuerpos anti-aminofosfolípidos desnudos para la administración humana estarán aproximadamente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o aproximadamente 30 miligramos más o menos por paciente; y las dosis útiles altas de anticuerpos anti-aminofosfolípidos desnudos para la administración humana serán de aproximadamente 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o aproximadamente 500 miligramos más o menos por paciente. Las dosis intermedias útiles de anticuerpos anti-aminofosfolípidos desnudos para la administración humana se contempla que sean aproximadamente 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 o aproximadamente 225 miligramos más o menos por paciente. Se contempla también cualquier gama particular que usa cualquier gama de las dosis mencionadas anteriormente a título de ejemplo, o cualquier valor intermedio entre las gamas establecidas particulares.

En general, serán preferentes las gamas de dosis de entre aproximadamente 5-100 miligramos, aproximadamente 10-80 miligramos, aproximadamente 20-70 miligramos, aproximadamente 25-60 miligramos, aproximadamente 30-50 miligramos más o menos de anticuerpos por paciente. Independientemente de estas gamas establecidas, se entenderá que, dados los parámetros y la orientación detallada presentada en la presente descripción, otras variaciones en las gamas activas u óptimas quedarán abarcadas dentro de la presente invención. Aunque la dosis de aproximadamente 5 ó 10 hasta aproximadamente 70, 80, 90 ó 100 miligramos por paciente se prefieren actualmente, se entenderá que dosis menores pueden ser más adecuadas en combinación con otros agentes, y que dosis mayores también pueden ser toleradas, particularmente dada la seguridad aumentada de los anticuerpos anti-aminofosfolípidos no conjugados a utilizar en la invención. El uso de anticuerpos anti-aminofosfolípidos humanos o humanizados desnudos vuelve a la presente invención aún más segura para uso clínico, reduciendo además las oportunidades de toxicidad significativa o efectos laterales en tejidos sanos.

El destino de los regímenes terapéuticos utilizados de la presente invención consiste en general en producir efectos anti-tumor 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 preferente es administrar entre aproximadamente 1-500 miligramos, y preferiblemente entre aproximadamente 10-100 miligramos del anticuerpo anti-aminofosfolípido, o cóctel terapéutico que contiene éste, aproximadamente 3 veces dentro de aproximadamente un período de 7 días. Por ejemplo, la dosis se daría en el día 1, día 3 ó 4, y día 6 ó 7.

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 preferente es emplear una infusión continua durante un período de tiempo de aproximadamente 1 ó 2 horas más o menos. Aunque no se requiere determinar estos parámetros antes del tratamiento usando la presente invención, se deberá observar que los estudios detallados en la presente descripción dan como resultado como mínimo alguna trombosis observada específicamente en los vasos sanguíneos del tumor sólido dentro de 12-24 horas aproximadamente de la inyección, y que las propias células tumorales empiezan a morir dentro de un período de 24 a 72 horas. La necrosis tumoral amplia se observa de modo general en las siguientes 48-96 horas aproximadamente, llegando a 60% de necrosis o valores superiores.

Naturalmente, antes de una utilización 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 está presentando como un alineamiento general para su uso para establecer estos ensayos.

Los pacientes elegidos para los primeros estudios de tratamiento de anticuerpo anti-aminofosfolípido han fallado en responder a como mínimo un curso de terapia convencional, y tendrán enfermedad objetivamente medible según se determina por examen físico, técnicas de laboratorio, y/o procedimiento radiográficos. Cualquier quimioterapia deberá ser interrumpida como mínimo dos semanas antes de entrar en el estudio. Cuando se emplean porciones de

anticuerpo o anticuerpos monoclonales murinos, los pacientes deberán no tener historia de alergia a la inmunoglobulina de ratón.

5 Se encontrarán varias ventajas en el uso de catéter venoso central interno con un puerto de lumen triple. Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos deberán filtrarse, por ejemplo, usando un filtro de 0, 22 μ , y diluirse adecuadamente, tal como mediante solución 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_{280} . La recuperación esperada deberá estar dentro de la gama de 87 por ciento a 99 por ciento, y se pueden determinar los ajustes por pérdida de proteína.

10 Estos anticuerpos anti-aminofosfolípidos se pueden administrar durante un período de 4-24 horas aproximadamente, recibiendo cada paciente 2-4 infusiones a intervalos de 2-7 días. La administración también se puede realizar mediante una proporción 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, o en un período particular de tiempo para una infusión de proporción estable, otras dosis deberán detenerse o parar la infusión de proporción estable a menos que mejore la toxicidad. Dosis crecientes de anticuerpos anti-aminofosfolípidos deberán administrarse a grupos de pacientes hasta que aproximadamente 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 segura.

20 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 cuentas sanguíneas completas, creatinina de suero, creatina quinasa, electrolitos, 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 los anticuerpos anti-aminofosfolípidos, y los anticuerpos contra cualquier porción de las mismas. Los análisis inmunológicos del suero, usando cualquier ensayo estándar tal como, por ejemplo, un ensayo ELISA o RIA, permitirá la farmacocinética y la aclaración del agente terapéutico de anti-aminofosfolípido que será evaluado.

30 Para evaluar las respuestas anti-tumor, los pacientes deberán ser examinados a 48 horas a 1 semana y después a 30 días después de la última infusión. Cuando se presente enfermedad palpable, deberán medirse diariamente dos diámetros perpendiculares de todas las masas durante el tratamiento, dentro de una semana después de completar la terapia, y a los 30 días. Para medir enfermedad no palpable, escaneos de CT 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 nuevamente 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.

35 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.

40 A la luz de los resultados de ensayos clínicos, tales como los descritos anteriormente, se puede formular todavía un régimen de tratamiento más preciso. Aún, alguna variación en dosis posteriormente puede ser necesaria dependiendo de la condición del sujeto que se está tratando. El médico responsable de la administración, a la luz de la presente descripción, será capaz de 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 indebida de experimentación.

I. Formación de imagen del tumor

50 Se da a conocer además el proporcionar tratamiento del tumor combinado y métodos de formación de imagen, basándose en ligandos de enlace anti-aminofosfolípidos. Las proteínas o anticuerpos de enlace anti-aminofosfolípidos que se enlazan a uno o más agentes detectables se consideran para su uso en la formación de imagen previa del tumor, formando una imagen confiable antes del tratamiento, lo cual a su vez dirige los marcadores de aminofosfolípidos. Además de anticuerpos, se prevé la utilización de anexinas marcadas de forma detectable y otros ligandos de unión de aminofosfolípidos, tal como se da a conocer y se reivindica en el número de publicación PCT WO-A-00/02587.

55 Los ligandos o anticuerpos anti-aminofosfolípidos que forman la imagen, o los conjugados de los mismos, generalmente comprenderán un anticuerpo anti-aminofosfolípido o ligando de enlace operativamente unido, o conjugado con una etiqueta detectable. Las etiquetas detectables son compuestos o elementos que se pueden detectar debido a sus propiedades funcionales específicas, o características químicas, el uso de las cuales permite

que el componente al cual estén unidas se detecte, y se cuantifique además si se desea. Preferiblemente, las etiquetas detectables son aquellas detectables *in vivo* usando métodos no invasivos.

5 Los anticuerpos y los conjugados de proteínas de enlace para su uso como agente de diagnóstico generalmente se dividen en dos clases, aquellos para su uso en diagnósticos *in vitro*, tales como una variedad de ensayos inmunológicos, y aquellos para su uso en protocolos de diagnóstico *in vivo*. Son los métodos de formación de imágenes *in vivo* los que se pretenden particularmente para su uso con los agentes de esta invención.

10 En la técnica se conocen muchos agentes para formación de imágenes adecuadas, como son los métodos para su unión con anticuerpos y ligandos de enlace (ver, por ejemplo, las Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.021.236 y 4.472.509). Ciertos métodos de unión comprenden el uso de un complejo quelado de metal que emplea, por ejemplo, un agente quelante orgánico, tal como un DTPA, unido al anticuerpo (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 4.472.509). Los anticuerpos monoclonales también se pueden hacer reaccionar con un enzima en presencia de un agente de acoplamiento tal como un glutaraldehído o periodato. Los conjugados con marcadores de fluoresceína se preparan en la presencia de estos agentes de acoplamiento o mediante la reacción con un isotiocianato.

15 Un ejemplo de etiquetas detectables son los iones paramagnéticos. En este caso, los iones adecuados 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 preferente el gadolinio.

20 Los iones útiles en otros contextos, tales como para formación de imágenes en rayos X, incluyen, pero sin limitación, lantano (III), oro (III), plomo (II), y especialmente bismuto (III). Las etiquetas fluorescentes incluyen rodamina, fluoresceína y renografina. La rodamina y la fluoresceína frecuentemente se enlazan a través de un intermediario isotiocianato.

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

30 Los anticuerpos y ligandos de enlace anti-aminofosfolípidos etiquetados 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 enlazar iones metálicos radioisotópicos con anticuerpos son ácido dietileno-triaminopentacético (DTPA) y ácido etileno-diaminotetracético (EDTA).

35 Los anticuerpos monoclonales también se pueden yodar en contacto con sodio o con yoduro de potasio y un agente oxidante químico tal como hipoclorito de sodio, o un agente oxidante enzimático, tal como lactoperoxidasa. Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos de acuerdo con la invención se pueden etiquetar con tecnecio ^{99m} mediante un proceso de intercambio de ligando, por ejemplo, reduciendo el pertechnetato con solución estañosa, quelando el tecnecio reducido sobre una columna de Sephadex y aplicando el anticuerpo a esta columna; o mediante técnicas de etiquetación directas, por ejemplo, incubando pertechnetato, un agente reductor tal como SnCl_2 , una solución reguladora tal como solución de ftalato de sodio-potasio, y el anticuerpo.

40 Cualquiera del tipo anterior de anticuerpos anti-aminofosfolípidos etiquetados detectablemente y ligandos de enlace de aminofosfolípidos se puede usar en los aspectos de formación de imágenes de la presente invención. Aunque no se propuso previamente para su uso en formación de imagen y tratamiento de tumores combinados, también se pueden emplear las anexinas etiquetadas detectablemente de la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.627.036; WO 95/19791; WO 95/27903; WO 95/34315; WO 96/17618; y WO 98/04294.

45 La Publicación Internacional WO 95/27903 proporciona anexinas para su uso para detectar células apoptóticas. Cualquiera de los marcadores de agentes detectables de anexina de la Publicación Internacional WO 95/27903 también se puede usar en la presente invención, aunque será conocido que algunas de éstas son más adecuadas para usos *in vitro*. La Publicación Internacional WO 95/27903 también se identifica como referencia con el fin de proporcionar equipos detectables que se puedan adaptar para uso combinado con los terapéuticos de la presente invención.

50 Cada una de las Publicaciones Internacionales WO 95/19791; WO 95/34315; WO 96/17618; y WO 98/04294 se identifican también con el fin de describir adicionalmente conjugados de anexina radioetiquetados para formación de imágenes de diagnóstico. El intento de cada uno de los documentos anteriores es proporcionar anexinas radioetiquetadas para su uso al formar imágenes de trombosis vascular, particularmente en el corazón o cerca del mismo, tales como en trombosis de venas profundas, embolias pulmonares, infarto al miocardio, fibrilación atrial, problemas con materiales cardiovasculares prostéticos, ataque, y similares. Estas anexinas radioetiquetadas también se propusieron para su uso para formar imágenes de plaquetas activadas, por ejemplo, en condiciones tales como abscesos, restenosis, inflamación de articulaciones, coágulos en arterias cerebrales, etcétera.

La Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.627.036 también se refiere generalmente a ligandos de enlace de anexina (anexín) para su uso para analizar fosfatidilserina de plaquetas. Se explica en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.627.036 que los desórdenes hemostáticos, tales como trombosis arterial, coronaria y venosa, usualmente son idiopáticas, lo que hace difícil la predicción y prevención. Para reconocer estos desórdenes hemostáticos con anterioridad, se propone la detección de plaquetas activadas. Las composiciones de anexina etiquetadas detectablemente se describen por lo tanto con el fin de detectar plaquetas activadas en desórdenes hemostáticos (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.627.036) .

Aunque se propone una gama amplia de usos de diagnóstico, ninguna de las Publicaciones Internacionales WO 95/19791; WO 95/34315; WO 96/17618; o WO 98/04294 hace referencia a formar imágenes de la vasculatura de los tumores sólidos. Tampoco la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.627.036 hace ninguna sugerencia. Sin embargo, las composiciones de anexina radioetiquetada y detectable descritas *per se* se pueden usar en este momento en provecho respecto a esto, a la luz de los sorprendentes descubrimientos descritos en la presente invención.

En particular, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.627.036 describe anexinas etiquetadas detectablemente con isotiocianato de fluoresceína; radioisótopos de halógenos, tecnecio, plomo, mercurio, talio o indio; y agentes de contraste paramagnéticos.

La Publicación Internacional WO 95/19791 da a conocer conjugados de anexina unidos a un quelato N_2S_2 que se puede radioetiquetar formando complejo de un radionuclido al quelado. La Publicación Internacional WO 95/34315 proporciona conjugados de anexina que comprenden uno o más residuos de galactosa con el quelato N_2S_2 . La fracción galactosa se dice que facilita la eliminación rápida del conjugado radioetiquetado a partir de la circulación, reduciendo el daño de radiación a tejidos no objetivos y el ruido de fondo.

La Publicación Internacional WO 96/17618 a su vez proporciona conjugados de anexina adecuados para radioetiquetar con agentes de formación de imagen de diagnóstico que comprenden una anexina con un ramillete de residuos de galactosa y un quelato N_2S_2 . Estos se da a conocer que tienen una vida media circulante más corta y una afinidad de enlace más alta para sitios objetivo que los conjugados de anexina-galactosa radioetiquetados anteriores.

Todavía otros conjugados de anexina radioetiquetados son proporcionados por la Publicación Internacional WO 98/04294. Estos conjugados comprenden una anexina que se modifica para proporcionar un grupo sulfidrido accesible conjugado con una fracción de hexosa que se reconoce por un receptor de hígado de mamífero. Los conjugados de multímeros de anexina y compuestos quelantes a través de enlaces sensibles a esterasa también se proporcionan.

Cada una de las Publicaciones Internacionales WO 95/19791; WO 95/34315; WO 96/17618; y WO 98/04294 también se identifican con el fin de proporcionar componentes conjugados de anexina para radioetiquetar que son dóciles para empaquetarlos en equipos fríos, es decir, en donde los componentes se proporcionan en frascos separados. La Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.627.036 similarmente proporciona equipos que comprenden un portador que está realizado por compartimientos para recibir anexinas etiquetadas detectablemente que se pueden adaptar para su uso en las mismas.

Aunque adecuados para su uso en diagnósticos *in vitro*, los presentes métodos de detección de aminofosfolípidos se destinan más para formar una imagen de la vasculatura de tumor de un paciente antes del tratamiento con formaciones de agente objetivo-agente terapéutico. El diagnóstico *in vivo* o los métodos de formación de imagen generalmente comprenden administrar a un paciente una cantidad diagnósticamente efectiva de un anticuerpo anti-aminofosfolípido o ligando de enlace que se conjuga con un marcador que es detectable mediante métodos no invasivos. El conjugado marcador de ligando de enlace o de anticuerpo se deja suficiente tiempo para localizar y enlazarse con el aminofosfolípido expresado en la superficie luminal de la vasculatura del tumor. El paciente se expone entonces a un dispositivo de detección para identificar el marcador detectable, formando por lo tanto una imagen de la vasculatura del tumor.

Los isótopos de resonancia de giro magnético nuclear, tales como el gadolinio, se detectan usando un dispositivo de formación de imagen magnético nuclear; y agentes radioactivos, tales como tecnecio^{99m} o indio¹¹¹, se detectan usando una cámara o detector de escintilación gama. La Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.627.036 también se identifica con el fin de proporcionar todavía guía adicional con respecto a la seguridad y la introducción efectiva de estas formaciones etiquetadas detectablemente en la sangre de un individuo, y medios para determinar la distribución de la anexina etiquetada detectablemente extracorporalmente, por ejemplo, usando una cámara de escintilación gama o mediante medición por resonancia magnética.

Las dosificaciones para realizaciones de formación de imagen generalmente son menores que para terapia, pero también dependen de la edad y el peso del paciente. Una dosis de una vez de entre 0, 1, 0, 5 o aproximadamente 1 miligramo y aproximadamente 9 ó 10 miligramos, o más preferiblemente de entre aproximadamente 1 miligramo y aproximadamente 5-10 miligramos de anticuerpo anti-aminofosfolípido o conjugado de ligando de enlace aminofosfolípido por paciente se contempla que es útil. La Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número

5.627.036; y la Publicación Internacional WO 95/19791, también son instructivas con respecto a las dosis de las anexas etiquetadas detectablemente.

J. Terapias de combinación

5 Los métodos de tratamiento de anticuerpo anti-aminofosfolípido de la presente invención se pueden combinar con cualquier otro método generalmente empleado en el tratamiento del tumor particular, enfermedad o desorden que muestra el paciente. En tanto no se sepa que el enfoque terapéutico particular es perjudicial a la condición del paciente en sí, y no contrarresta significativamente el tratamiento del anticuerpo anti-aminofosfolípido, se considera su combinación con la presente invención.

10 En relación con el tratamiento del tumor sólido, la presente invención se puede usar en combinación con enfoques clásicos, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia, y similares. La presente descripción por lo tanto proporciona terapias combinadas en las cuales se usan los anticuerpos anti-aminofosfolípidos simultáneamente con, antes, o después de la cirugía o tratamiento por radiación; o se administran a pacientes con, antes de, o después de agentes quimioterapéuticos, radioterapéuticos o anti-angiogénicos convencionales, o inmunotoxinas o coagulandos objetivos.

15 La terapia de combinación se contempla también para otras enfermedades vasculares. Un ejemplo particular es la hiperplasia prostática benigna (BPH), la cual se puede tratar con anticuerpos anti-aminofosfolípidos en combinación con otros tratamientos actualmente practicados en la técnica. Por ejemplo, el ataque de inmunotoxinas a marcadores localizados dentro de la BPH, tales como PSA.

20 Cuando se usan uno o más agentes en combinación con la terapia de anticuerpo anti-aminofosfolípido, no hay requisito para que los resultados combinados sean aditivos de los efectos observados cuando se conduce cada tratamiento por separado. Aunque como mínimo efectos aditivos generalmente son deseables, cualquier efecto anti-tumor aumentado por encima de una de las terapias singulares será benéfico. También, no hay requisito particular para que el tratamiento combinado muestre efectos sinérgicos, aunque ciertamente esto es posible y ventajoso. Los agentes especialmente previstos para su utilización para conseguir efectos potencialmente sinérgicos son los que alteran o inducen apoptosis en el endotelio del tumor, dado que dichas alteración o apoptosis deben amplificar el efecto terapéutico general.

30 Para practicar la terapia anti-tumor combinada, simplemente se administraría a un animal un anticuerpo anti-aminofosfolípido en combinación con otro agente anticáncer de una manera efectiva para dar como resultado acciones anti-tumor combinadas dentro del animal. Los agentes por lo tanto se proporcionarían en cantidades efectivas y por periodos de tiempo efectivos para dar como resultado la presencia combinada dentro de la vasculatura del tumor y sus acciones combinadas en el ambiente del tumor. Para lograr esta meta, los anticuerpos anti-aminofosfolípidos y los agentes anticáncer se pueden administrar al animal simultáneamente, ya sea en una sola composición, o como dos composiciones distintas usando diferentes rutas de administración.

35 De manera alternativa, el tratamiento de anticuerpo anti-aminofosfolípido puede preceder, o seguir, al tratamiento de agente anticáncer en, por ejemplo, intervalos que varían de minutos a semanas. En ciertas realizaciones en donde el agente anticáncer y el anticuerpo anti-aminofosfolípido se aplican por separado al animal, aseguraría que no expiró un período de tiempo significativo entre el tiempo de cada administración, de manera que la combinación de agente anticáncer y anticuerpo anti-aminofosfolípido todavía sería capaz de ejercer un efecto combinado ventajoso en el tumor. En estos casos, se contempla que se pondría en contacto el tumor con ambos agentes dentro de aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente una semana uno del otro, y más preferiblemente, dentro de aproximadamente 12-72 horas uno del otro, con un tiempo de retardo de solamente aproximadamente 12-48 horas, siendo lo más preferente.

45 Los agentes anticáncer que, a título de ejemplo, se darían antes del anticuerpo anti-aminofosfolípido son agentes que inducen la expresión de aminofosfolípidos dentro de la vasculatura del tumor. Por ejemplo, los agentes que estimulan la producción de calcio localizado y/o que inducen la apoptosis generalmente darían como resultado la expresión de PS aumentada, lo cual se puede tener como objetivo usando un anticuerpo anti-PS posterior. Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos se administrarían primero en otras situaciones para causar la destrucción del tumor, seguido por terapias anti-angiogénicas o terapias dirigidas para dar al blanco en células del tumor necróticas.

50 El uso general de combinaciones de agentes en el tratamiento del cáncer es muy conocido. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.710.134 describe componentes que inducen necrosis en tumores en combinación con agentes no tóxicos o profármacos. Las enzimas que quedan libres por los procesos necróticos disocian el profármaco no tóxico en fármaco tóxico, lo cual conduce a la muerte celular del tumor. También, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.747.469 describe el uso combinado de vectores virales que codifican agentes que dañan p53 y ADN. Cualquiera de estos enfoques similares se puede usar con la presente invención.

55 En algunas situaciones, puede ser deseable extender el período de tiempo para el tratamiento de manera significativa, en donde lapsos de varios días (2, 3, 4, 5, 6 ó 7), varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8), o aún varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas. Esto sería ventajoso en circunstancias en

5 donde un tratamiento se destinó para destruir sustancialmente el tumor, tal como el tratamiento de anticuerpo anti-aminofosfolípido, y otro tratamiento se destinó a evitar la micrometástasis o recrecimiento de tumor, tal como la administración de agente anti-angiogénico. El anticuerpo EN 7/44 de Hagemeyer y otros (1986) no se cree que sea un agente anti-angiogénico efectivo, careciendo de enlace con un antígeno accesible de superficie, entre otras deficiencias.

10 También se considera que más de una administración del anticuerpo anti-aminofosfolípido o del agente anticáncer se utilizará. Los anticuerpos anti-aminofosfolípidos y agentes anticáncer se pueden administrar intercambiabilmente, o en días o semanas alternados; o una secuencia de tratamiento de anticuerpo anti-aminofosfolípido se puede dar, seguida por una secuencia de terapia de agentes anticáncer. En cualquier caso, para lograr la regresión del tumor usando una terapia combinada, todo lo que se requiere es administrar ambos agentes en una cantidad combinada efectiva para ejercer un efecto anti-tumor, independientemente de los tiempos para la administración.

15 En términos de cirugía, cualquier intervención quirúrgica se puede practicar en combinación con la presente invención. En relación con radioterapia, cualquier mecanismo para inducir daño de ADN localmente dentro de las células del tumor está contemplado, tal como irradiación γ , rayos X, irradiación ultravioleta, microondas y hasta emisiones electrónicas y similares. La administración dirigida de radioisótopos a las células del tumor también se contempla, y esto se puede usar en relación con un anticuerpo objetivo u otros elementos objetivos.

20 La terapia de citocinas ha demostrado también ser un asociado efectivo para los regímenes de terapias combinadas. Se pueden emplear varias citocinas en estos enfoques combinados. Ejemplos de citocinas incluyen IL-1 α , IL-1 β , 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, TNF α , TNF β , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ . Las citocinas se administran de conformidad con regímenes estándares, consistentes con indicaciones clínicas, tales como la condición del paciente y la toxicidad relativa de la citocina. También se usan uteroglobinas para evitar o inhibir la metástasis (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.696.092) .

J1. Quimioterapéuticos

25 En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-aminofosfolípidos de la presente invención se pueden administrar en combinación con un agente quimioterapéutico. Los fármacos quimioterapéuticos pueden matar células de tumor proliferantes, aumentando las áreas necróticas creadas por el tratamiento global. Los fármacos pueden de esta manera aumentar la acción trombótica de los anticuerpos anti-aminofosfolípidos.

30 Induciendo la formación de trombos en los vasos del tumor, los anticuerpos anti-aminofosfolípidos pueden aumentar la acción de los quimioterapéuticos reteniendo o atrapando los fármacos dentro del tumor. Los quimioterapéuticos se retienen en sí dentro del tumor, al mismo tiempo que el resto del fármaco se elimina del cuerpo. Las células del tumor se exponen por lo tanto a una concentración más alta de fármaco durante un período de tiempo más largo. Este atrapamiento de fármaco dentro del tumor hace posible reducir la dosis del fármaco, haciendo el tratamiento más seguro, así como más efectivo.

35 Independientemente de los mecanismos subyacentes, se puede usar una variedad de agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinados descritos en la presente descripción. Los agentes quimioterapéuticos contemplados a título de ejemplo incluyen, por ejemplo, tamoxifén, taxol, vincristina, vinblastina, etoposida (VP-16) , adriamicina, 5-fluorouracilo (5FU) , camptotecina, actinomicín-D, mitomicín C, cisplatín (CDDP) , combretastatinas y derivados y profármacos de los mismos.

40 Como se entenderá por los expertos en la técnica, las dosis adecuadas de agentes quimioterapéuticos generalmente estarán alrededor de las ya empleadas en terapias clínicas, en donde se administran los agentes quimioterapéuticos solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. A manera de ejemplo solamente, agentes tales como cisplatina, y otros alquilantes de ADN se pueden usar. La cisplatina se ha usado ampliamente para tratar el cáncer, con dosis eficaces usadas en aplicaciones clínicas de 20 miligramos/m² durante 5 días cada tres semanas durante un total de tres cursos. La cisplatina no se absorbe oralmente, y por lo tanto se debe administrar a través de inyección intravenosamente, subcutáneamente, intratumoralmente o intraperitonealmente.

50 Otros agentes útiles incluyen compuestos que interfieren con la réplica de ADN, mitosis, segregación cromosomal y/o actividad tubulina. Estos compuestos quimioterapéuticos incluyen adriamicina, también conocida como doxorubicina, etoposida, verapamil, podofilotoxina, combretastanina y similares. De uso muy amplio en el ámbito clínico para el tratamiento de neoplasmas, estos compuestos se administran a través de inyecciones de bolo intravenosamente a dosis que varían desde 25-75 miligramos/m² a intervalos de 21 días para la adriamicina, hasta 35-50 miligramos/m² por vía intravenosa para etoposida o el doble de la dosis intravenosa oralmente.

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

5 Los agentes quimioterapéuticos que, a título de ejemplo, son útiles en relación con la terapia combinada se detallan en la Tabla B. Cada uno de los agentes detallado en la presente tabla lo son a título de ejemplo y de ninguna manera son limitantes. El técnico experto se dirige a Remington's Pharmaceutical Sciences 15^a Edición, capítulo 33, en particular las páginas 624-652. Cualquier variación en la dosis necesariamente se presentará dependiendo de la condición del sujeto que se está tratando. El médico responsable para la administración será capaz de determinar la dosis adecuada para el sujeto individual.

TABLA B Agentes quimioterapéuticos útiles en enfermedad neoplásica

CLASE	TIPO DE AGENTE	NOMBRES NO COMERCIALES (OTROS NOMBRES)	ENFERMEDAD
<i>Agentes Alquilantes</i>	Mostazas de Nitrógeno	Mecloretamina (HN ₂)	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no de Hodgkin
		Ciclofosfamida Ifosfamida	Leucemias linfocíticas agudas y crónicas, enfermedad de Hodgkin, linfomas no de Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, pecho, ovario, pulmón, tumor de Wilms, cérvix, testículos, sarcomas de tejido suave
		Melphalan (1-sarcolisina)	Mieloma múltiple, pecho, ovario
		Clorambucil	Leucemia linfocítica crónica, macroglobulinemia primaria, enfermedad de Hodgkin, linfomas no de Hodgkin
	Etileniminos y metilmelaminas	Hexametilmelamina	Ovario
		Thiotepa	Vejiga, pecho, 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 de Hodgkin, tumores de cerebro primario, pulmón de célula pequeña
		Semustina (metil-CCNU)	Tumores de cerebro primario, estómago, colon
		Streptozocina (streptozotocina)	Insulinoma pancreática maligna, carcinoide maligno

<p><i>Agentes Alquilantes, continuación</i></p>	<p>Triazinas</p>	<p>Dacarbazina (DTIC; dimethyl-triazenoimidazolecarboxamide)</p>	<p>Melanoma maligno, enfermedad de Hodgkin, sarcomas de tejido blando</p>
<p><i>Antimetabolitos</i></p>	<p>Análogos de Ácido Fólico</p>	<p>Metotrexato (ametofterina)</p>	<p>Leucemia linfocítica aguda, coriocarcinoma, micosis fungoides, sarcoma de pecho, cabeza y cuello, pulmón, osteogénico</p>
	<p>Análogos de Pirimidina</p>	<p>Fluoracil (5-fluorouracil; 5-FU) Floxuridina (fluorodeoxyuridina; FUdR)</p>	<p>Pecho, colon, estómago, páncreas, ovario, cabeza y cuello, vejiga urinaria, lesiones de piel premalignas (tópicas)</p>
		<p>Cytarabina (citosina arabinosida)</p>	<p>Leucemias granulocíticas y linfocíticas agudas</p>
	<p>Análogos de purina e inhibidores relacionados</p>	<p>Mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP)</p>	<p>Leucemias linfocíticas agudas, granulocíticas agudas y granulocíticas crónicas</p>
		<p>Tioguanina (6-tioguanina; TG)</p>	<p>Leucemias granulocítica aguda, linfocítica aguda y granulocítica crónica</p>
		<p>Pentostatina (2-desoxicoformicina)</p>	<p>Leucemia de células vellosas, micosis fungoide, leucemia linfocítica crónica</p>
<p><i>Productos Naturales</i></p>	<p>Alcaloides Vinca</p>	<p>Vinblastina (VLB)</p>	<p>Enfermedad de Hodgkin, linfomas no de Hodgkin, de pecho, de testículos</p>
		<p>Vincristina</p>	<p>Leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma, tumor de Wilms, rabdomiosarcoma, enfermedad de Hodgkin, linfomas no de Hodgkin, de pulmón de células pequeñas</p>

Productos Naturales, continuación	Epipodofilotoxinas	Etoposida Tertiposida	Enfermedades de testículos, de pulmón de células pequeñas y otros de pulmón, pecho, enfermedad de Hodgkin, linfomas no de Hodgkin, leucemia granulocítica aguda, sarcoma de Kaposi
	Antibióticos	Dactinomicina (actinomicina D)	Coriocarcinoma, tumor de Wilms, rhabdomyosarcoma, sarcoma de testículos, sarcoma de Kaposi
		Daunorubicina (daunomicina; rubidomicina)	Leucemias granulocítica aguda y linfocítica aguda
		Doxorubicina	Sarcomas de tejidos blandos, osteogénicos y otros sarcomas; enfermedad de Hodgkin, linfomas no de Hodgkin, leucemias agudas, enfermedades del pecho, aparato genitourinario, tiroides, pulmón, estómago, neuroblastoma
		Bleomicina	Testículos, cabeza y cuello, piel, esófago, pulmón y vías genitourinarias; enfermedad de Hodgkin, linfomas no de Hodgkin
		Plicamicina (mitramicina)	Testículos, hipercalcemia maligna
		Mitomicina (mitomicina C)	Estómago, cervix, colon, pecho, páncreas, vejiga, cabeza y cuello
	Enzimas	L-Asparaginasa	Leucemia linfocítica aguda
	Modificadores de Respuesta Biológica	Interferon alfa	Leucemia de células vellosas, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinoide, de células renales, de ovarios, de vejiga, linfomas no de Hodgkin, micosis fungoide, mieloma múltiple, leucemia granulocítica crónica

<i>Agentes varios</i>	Complejos de coordinación de platino	Cisplatino (cis-DDP) Carboplatino	Testículos, ovario, vejiga, cabeza y cuello, pulmón, tiroides, cérvix; endometrio, neuroblastoma, sarcoma osteogénico
	Antracenediona	Mitoxantrona	Leucemia granulocítica aguda, pecho
	Urea sustituida	Hydroxiurea	Leucemia granulocítica crónica, policitemia vera, trombocitosis esencial, melanoma maligno
	Derivado de Metilhidrazina	Procarbazina (N-metilhidrazina, MIH)	Enfermedad de Hodgkin
	Supresor adrenocortical	Mitotano (o,p'-DDD)	Corteza adrenal
Aminoglutetimidina		Pecho	
<i>Hormonas y Antagonistas</i>	Adrenocorticoesteroides	Prednisona (diversas preparaciones equivalentes disponibles)	Leucemias linfocíticas aguda y crónica, linfomas no de Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, pecho
	Progestinas	Hidroxyprogesterona caproato Medroxyprogesterona acetato Megestrol acetato	Endometrio, pecho
	Estrógenos	Dietilestilbestrol Etinil estradiol (otras preparaciones disponibles)	Pecho, próstata
	Antiestrógeno	Tamoxifeno	Pecho

<i>Hormonas y Antagonistas, continuación</i>	Andrógenos	Testosterona propionato Fluoximesterona (otras preparaciones disponibles)	Pecho
	Antiandrógeno	Flutamida	Próstata
	Análogo de hormona liberadora de gonadotropina	Leuprolida	Próstata

J2. Anti-angiogénicos

5 El término angiogénesis se refiere a la generación de nuevos vasos sanguíneos, generalmente en un tejido u órgano. En condiciones fisiológicas normales, los humanos y los animales sufren angiogénesis solamente en situaciones restringidas muy específicas. Por ejemplo, la angiogénesis normalmente se observa en la cicatrización de heridas, el desarrollo fetal y embrionario y en la formación del corpus luteum, endometrio y placenta. La angiogénesis no controlada (persistente y/o no regulada) se relaciona con varios estados de enfermedad, y se presenta durante el crecimiento y metástasis de tumores.

10 Tanto la angiogénesis controlada como la no controlada se piensa que proceden de manera similar. Las células y pericitos endoteliales, rodeados por una membrana de base, forman los vasos sanguíneos capilares. La angiogénesis comienza con la erosión de la membrana de base por las enzimas liberadas por las células endoteliales y los leucocitos. Las células endoteliales, que linean el lumen de vasos sanguíneos, sobresalen a través de la membrana de base. Los estimulantes angiogénicos inducen que las células endoteliales migren a través de la
15 membrana de base erosionada. Las células migrantes forman un pico fuera del vaso sanguíneo padre, en donde las células endoteliales sufren mitosis y proliferan. Los picos endoteliales surgen uno con otro para formar ciclos capilares, creando el nuevo vaso sanguíneo.

20 Conforme se presenta angiogénesis persistente, no regulada, durante el desarrollo del tumor y la metástasis, los métodos del tratamiento de esta invención se pueden usar en combinación con cualquiera o más terapias anti-angiogénicas. Los agentes anti-angiogénicos que, a título de ejemplo, son útiles en relación con la terapia combinada se detallan en la Tabla C. Cada uno de los agentes detallados en la misma se ha indicado a título de ejemplo y sin carácter limitativo.

TABLA C *Inhibidores y reguladores negativos de angiogénesis*

AGENTES	REFERENCIAS
Angiostatina	O'Reilly y otros, 1994
Endostatina	O'Reilly y otros, 1997
Fragmento de prolactina 16kDa	Ferrara y otros, 1991; Clapp y otros, 1993; D'Angelo y otros, 1995; Lee y otros, 1998
Péptidos de laminina	Kleinman y otros, 1993; Yamamura y otros, 1993; Iwamoto y otros, 1996; Tryggvason, 1993
Péptidos de fibronectina	Grant y otros, 1998; Sheu y otros, 1997
Inhibidores de metaloproteinasa de tejido (TIMP 1, 2, 3, 4)	Sang, 1998
Inhibidores de activadores de plasminógeno (PAI-1, -2)	Soff y otros, 1995
Factor de necrosis de tumor α (dosis alta, <i>in vitro</i>)	Frater-Schroder y otros, 1987
TGF- β 1	RayChadhury y D'Amore, 1991; Tada y otros, 1994.
Interferona (IPN- α , - β , γ)	Moore y otros, 1998; Lingen y otros, 1998
ELR-CXC quimiocinas; IL-12; SDF-1; MIG; Factor de plaqueta 4 (PF-4); IP-10	Moore y otros, 1998; Hiscox y Jiang, 1997; Coughlin y otros, 1998; Tanaka y otros, 1997.
Trombospondina (TSP)	Good y otros, 1990; Frazier, 1991; Bornstein, 1992; Tolsma y otros, 1993; Sheibani y Frazier, 1995; Volpert y otros, 1998.
SPARC	Hasselaar y Sage, 1992; Lane y otros, 1992; Jendraschak y Sage, 1996

2-Metoxiestradiol	Fotsis y otros, 1994
Proteína relacionada con proliferina	Jackson y otros, 1994
Suramina	Gagliardi y otros, 1992; Takano y otros, 1994; Waltenberger y otros, 1996; Gagliardi y otros, 1998, Manetti y otros, 1998.
Talidomida	D'Amato y otros, 1994; Kenyon y otros, 1997; Wells, 1998.
Cortisona	Thorpe y otros, 1993; Folkman y otros, 1983; Sakamoto y otros, 1986.
Linomida	Vukanovic y otros, 1993; Ziche y otros, 1998; Nagler y otros, 1998
Fumagilina (AGM-1470, TNP-470)	Sipos y otros, 1994; Yoshida y otros, 1998
Tamoxifen	Gagliardi y Collins, 1993; Linder y Borden, 1997; Haran y otros, 1994.
Extracto de muérdago coreano (<i>Viscum album coloratum</i>)	Yoon y otros, 1995
Retinoides	Oikawa y otros, 1989; Lingen y otros, 1996; Majewski y otros, 1996
CM101	Hellerqvist y otros, 1993; Quinn y otros, 1995; Wamil y otros, 1997; DeVore y otros, 1997
Dexametasona	Hori y otros, 1996; Wolff y otros, 1997
Factor inhibitorio de leucemia (LIF)	Pepper y otros, 1995

5 Un componente preferente para su uso para inhibir la angiogénesis es una proteína llamada angiostatina. Este componente se describe en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica 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 por reducción de 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 aminoácido sustancialmente similar a la de un fragmento de plasminógeno murino que comienza en el aminoácido número 98 de una molécula de plasminógeno murino intacto.

La secuencia de aminoácidos de la angiostatina varía ligeramente entre las especies. Por ejemplo, en la angiostatina humana, la secuencia de aminoácidos 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 ó 99 de una secuencia de aminoácidos de plasminógeno humano intacta. Además, el plasminógeno humano se puede usar, ya que tiene actividad anti-angiogénica similar, como se muestra en un modelo de tumor de ratón.

Ciertas terapias anti-angiogénicas se ha mostrado ya que causan regresiones de tumor, y la angiostatina es uno de estos agentes. La endostatina, un fragmento terminal COOH de 20 kDa de colágeno XVIII, el polisacárido bacteriano CM101, y el anticuerpo LM609 también tienen actividad angiostática. Sin embargo, a la luz de otras propiedades, se conocen como terapias antivasculares o toxinas de vasos de tumor, ya que no sólo inhiben la angiogénesis, sino también inician la destrucción de los vasos del tumor a través de mecanismos en su mayor parte no definidos. Su combinación con la presente invención se considera claramente.

La angiostatina y la endostatina se han vuelto 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 (GM-CSF) regula hacia arriba 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 descubrimiento 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 estromelisinina-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 enlaza con un receptor superficial de la célula no identificado sobre células endoteliales que inducen que la célula endotelial sufra muerte celular programada, o detención mitótica. La endostatina parece ser un agente aún más poderoso anti-angiogénesis y agente anti-tumor, aunque su biología es mucho menos clara. La endostatina es efectiva 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. La endostatina se piensa también que se enlaza con un receptor superficial de células endoteliales no identificado que media su efecto.

La CM101 es un polisacárido bacteriano que se ha caracterizado bien por su capacidad para inducir inflamación neovascular en tumores. El CM101 se enlaza con y reticula receptores expresados en endotelio desdiferenciado que estimula la activación del sistema de complemento. También inicia una respuesta inflamatoria conducida por citocina que selectivamente ataca al tumor. Es un agente antipatoangiogénico exclusivo que regula hacia abajo 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 la presente invención.

La tromboespondina (TSP-1) y el factor de plaqueta 4 (PF4) también se pueden usar en combinación con la presente invención. Ambos son inhibidores de angiogénesis que se asocian con heparina y se encuentran en α -gránulos 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 enlaza 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 *in 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 dramática en la producción de la TSP-1 y un aumento concomitante en la angiogénesis iniciada por tumor.

La PF4 es una proteína 70aa que es miembro de la familia CXC ELR de quimiocinas que es capaz de inhibir potentemente la proliferación de células endoteliales *in vitro*, y la angiogénesis *in vivo*. La PF4 administrada intratumoralmente o administrada mediante 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 combinar con la presente invención. La actividad anti-endotelial de las interferonas 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 anti-angiogénica *in vivo* que posiblemente es mediada por una capacidad para inhibir la producción de promotores angiogénicos por las células del tumor. Los tumores vasculares en particular son sensibles a la interferona, por ejemplo, los hemangiomas proliferantes se pueden tratar con éxito con IFN α .

Los inhibidores de tejido de las metaloproteinasas (TIMPs) son una familia de inhibidores que se presentan naturalmente de metaloproteasas de matriz (MMPs) que también pueden inhibir la angiogénesis y se pueden usar en protocolos de tratamiento combinados con la presente invención. Las MMPs 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, un miembro de las MMPs, MMP-2, se ha demostrado que se asocia con el endotelio activado a través de la integrina $\alpha_v\beta_3$, presumiblemente con este fin. Si esta interacción se interrumpe por un fragmento de MMP-2, entonces la angiogénesis se regula hacia abajo 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 en combinación con la presente invención. Éstos 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 *in vivo*. La TNP-470 se ha estudiado extensamente en ensayos clínicos humanos con datos que sugieren que la administración a largo plazo es óptima.

La talidomida originalmente se usó como un sedante, pero se encontró que es un potente teratógeno y se discontinuó. En 1994 se encontró que la talidomida es un inhibidor de la angiogénesis. La talidomida actualmente está en ensayos clínicos como un agente anticáncer, así como un tratamiento de enfermedades vasculares del ojo.

El CAI es un inhibidor sintético de bajo peso molecular de la angiogénesis que actúa como un bloqueador de canal de calcio que evita 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 oralmente 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 la heparina o fragmentos de heparina ha demostrado inhibir el crecimiento de tumores en ratones, bloqueando la proliferación de células endoteliales. El mecanismo involucrado en el efecto inhibitorio 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 anti-tumor de actividad *in vivo*.

Otros inhibidores de angiogénesis específicos incluyentes pero no limitativos, son Factor Anti-invasivo, ácidos retinoicos y paclitaxel (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.716.981); AGM-1470 (Ingber y otros, 1990); extracto de cartilago de tiburón (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.618.925); poliamida aniónica u oligómeros de poliurea (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.593.664); derivados de oxindol (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.576.330); derivados de estradiol (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.504.074); y derivados de tiazolpirimidina (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.599.813) también se contemplan para su uso como composiciones anti-angiogénicas 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 de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.766.591, los polipéptidos que contienen RGD y sales de los mismos, que incluyen polipéptidos cíclicos, son ejemplos adecuados de antagonistas de integrina $\alpha_v\beta_3$.

El anticuerpo LM609 contra la integrina $\alpha_v\beta_3$ también induce regresiones de tumores. Los antagonistas de integrina $\alpha_v\beta_3$, tales como LM609, inducen la apoptosis de las células endoteliales angiogénicas dejando los vasos sanguíneos quiescentes no afectados. La LM609 u otros antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ también pueden trabajar inhibiendo la interacción de $\alpha_v\beta_3$ y MMP-2, una enzima proteolítica que se piensa que representa un papel importante en la migración de células endoteliales y fibroblastos.

La apoptosis del endotelio angiogénico en este caso puede tener un efecto de cascada sobre el resto de la red vascular. Al inhibir la red vascular del tumor de responder completamente a la señal del tumor para extenderse se puede, de hecho, iniciar el colapso parcial o completo de la red, dando como resultado la muerte celular del tumor y pérdida del volumen del tumor. Es posible que la endostatina y la angiostatina funcionen de una manera similar. El hecho de que la LM609 no afecta a los vasos quiescentes, pero es capaz de causar regresiones de tumor, sugiere en gran medida que no todos los vasos sanguíneos en el tumor necesitan ser usados como blanco para el tratamiento, con el fin de obtener un efecto antitumor.

Las angiopoyetinas dirigidas y no dirigidas, tales como la angiopoyetina-2, también se pueden usar en combinación con la presente invención (ver explicación a continuación sobre angiopoyetinas direccionadas). La angiopoyetina-2 (SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4) es un ligando para Tie2 y de manera general contrarresta la maduración/estabilidad de vasos sanguíneos mediada por angiopoyetina-1. Por lo tanto, es un antagonista de la angiopoyetina-1 y actúa alterando la estructura capilar. En ausencia de otras señales angiogénicas (tal como VEGF), la angiopoyetina-2

provoca que los vasos se desestabilicen y resulten inmaduros (Holash y otros, 1999) . La disposición de la angiopoyetina-2 dirigida o no dirigida en relación con los métodos de la presente invención se prevé por lo tanto particularmente en tumores con niveles bajos de VEGF y/o con una combinación de inhibición de VEGF. La manipulación de la angiopoyetina-1 y dos nuevas angiopoyetinas, angiopoyetina-3 (ratón) y angiopoyetina-4 (humana) , se podrían utilizar también conjuntamente con esta invención.

Otros métodos de intervención terapéutica basada en las señales de alteración a través del receptor Tie2 también se pueden usar en combinación con la presente invención, tal como usando un receptor soluble Tie2 capaz de bloquear la activación de Tie2 (Lin y otros, 1998) . La administración de esta formación usando terapia de genes adenovirales recombinantes se puede mostrar que es efectiva para tratar cáncer y reducir metástasis (Lin y otros, 1998) .

10 J3. Agentes que inducen la apoptosis

El tratamiento de agente objetivo-agente terapéutico también se puede combinar con métodos de tratamiento que inducen la apoptosis en las células dentro del tumor, incluyendo las células del tumor y las células endoteliales vasculares del tumor. Aunque muchos agentes anticáncer pueden tener, como parte de su mecanismo de acción, un efecto que induce la apoptosis, ciertos agentes se han descubierto, diseñado o seleccionado con esta característica como un mecanismo primario, como se describe más adelante.

Varios oncógenos se han descrito que inhiben la apoptosis, o la muerte celular programada. Los oncógenos a título de ejemplo en esta categoría incluyen, pero sin limitación, bcr-abl, bcl-2 (distinto de bcl-1, ciclín D1; número de acceso del GenBank M14745, X06487; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica 5.650.491 y 5.539.094) , y miembros de la familia que incluyen Bcl-xl, Mcl-1, Bak, A1, A20. La sobreexpresión de bcl-2 se descubrió primero en linfomas de células T. El bcl-2 funciona como un oncógeno enlazando e inactivando Bax, una proteína en la trayectoria apoptótica. La inhibición de la función de bcl-2 previene la inactivación de Bax, y permite que continúe la trayectoria apoptótica. Por lo tanto, la inhibición en esta clase de oncógenos, por ejemplo, usando secuencias de nucleótido antisentido, se contempla para su uso en la presente invención en aspectos en donde el aumento de la apoptosis se desea (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.650.491; 5.539.094 y 5.583.034) .

Muchas formas de cáncer tienen informes de mutación en los genes supresores de tumores, tales como p53. La inactivación de p53 da como resultado un fallo para promover la apoptosis. Con esta falla, las células del cáncer progresan en la tumorigénesis, en vez de volverse destinadas para la muerte celular. Por lo tanto, la disposición de los supresores del tumor también se contempla para su uso en la presente invención para estimular la muerte celular. Los supresores de tumor, a título de ejemplo, incluyen, pero sin limitación, 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) , gen supresor de tumor múltiple (MTS-1) , BRCA1 y BRCA2.

Se prefieren para su uso el p53 (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.747.469; 5.677.178 y 5.756.455) , Retinoblastoma, BRCA1 (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 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) , MEN-1 (número de acceso GenBank U93236) y genes de adenovirus E1A (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica 5.776.743) .

Otras composiciones que se pueden usar incluyen genes que codifican el factor de necrosis de tumor relacionado con apoptosis que induce ligandos denominados TRAIL, y el polipéptido TRAIL (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.763.223) ; la proteasa asociada con apoptosis de 24 kD de la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica 5.605.826; el factor asociado Fas 1, FAF1 (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica 5.750.653) . También se contempla para su uso en estos aspectos de la presente invención la disposición de la enzima que se convierte en interleucina-1 β y los miembros de la familia, los cuales se da a conocer también que estimulan la apoptosis.

Los compuestos tales como derivados de carbostirilo (Patente de los Estados Unidos Número 5.672.603; y 5.464.833) ; los péptidos apogénicos ramificados (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica 5.591.717) ; inhibidores de fosfotirosina y análogos de fosfotirosina no hidrolizables (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.565.491; y 5.693.627) ; agonistas de receptores de retinoide RXR (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.399.586) ; y hasta antioxidantes (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.571.523) también se pueden usar. Los inhibidores de tirosinaquinasa, tales como genisteína, también se pueden enlazar a ligandos que se dirigen a un receptor superficial de la célula (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.587.459) .

J4. Inmunotoxinas y coaguligandos

Los métodos de tratamiento de anticuerpo anti-aminofosfolípido desnudo de la presente invención se pueden usar en combinación con otras inmunotoxinas y/o coaguligandos, en donde la porción objetivo de la misma, por ejemplo, el anticuerpo o ligando, ataca a un marcador relativamente específico de células del tumor, la vasculatura del tumor o el estroma del tumor. En común con los agentes quimioterapéutico y anti-angiogénicos comentados anteriormente, el uso de un anticuerpo anti-aminofosfolípido en combinación con una toxina direccionada o coagulante resultará de modo general en que los agentes distintos sean dirigidos contra diferentes objetivos dentro del medio ambiente del

tumor. Esto debería resultar en resultados antitumorales aditivos, marcadamente superiores que aditivos o incluso sinérgicos.

Hablando en general, los anticuerpos o ligandos para su uso en estos aspectos adicionales preferiblemente reconocerán antígenos accesibles al tumor que preferentemente, o específicamente, se expresan en el sitio del tumor. Los anticuerpos o ligandos también preferiblemente mostrarán propiedades de alta afinidad; y los anticuerpos, ligandos o conjugados de los mismos, no ejercerán efectos laterales *in vivo* significativos contra tejidos normales que sostienen la vida, tales como uno o más tejidos seleccionados del corazón, riñón, cerebro, hígado, médula ósea, colon, pecho, próstata, tiroide, vesícula biliar, pulmón, adrenales, músculos, fibras nerviosas, páncreas, piel, u otros órganos que sostienen la vida o tejido en el cuerpo humano. El término efectos laterales significativos, como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo, ligando o conjugado de anticuerpo que, cuando se administra *in vivo*, producirá solamente efectos laterales despreciables o clínicamente manejables, tales como los normalmente encontrados durante la quimioterapia.

Como mínimo una región de enlace de estos segundos agentes anticáncer empleados en combinación con los anticuerpos anti-aminofosfolípidos de la invención será un componente que sea capaz de administrar una toxina o factor de coagulación a la región del tumor, es decir, capaz de localizarse dentro del sitio del tumor. Estos agentes objetivo se pueden dirigir contra un componente de una célula de tumor, vasculatura de tumor o estroma de tumor. Los agentes objetivo generalmente se enlazan a un componente localizado en superficie, accesible en superficie o expresado en superficie de una célula de tumor, vasculatura de tumor o estroma de tumor. Sin embargo, en cuanto comienza la destrucción de la vasculatura del tumor y la célula del tumor, los componentes internos se liberarán, permitiendo el ataque adicional de virtualmente cualquier componente del tumor.

Muchos antígenos de células de tumor se han descrito, cualquiera de los cuales podría emplearse como objetivo en relación con los aspectos combinados de la presente invención. Los antígenos de células de tumor adecuados para dirigir el blanco de inmunotoxinas y coagulandos adicionales incluyen aquellos reconocidos mediante los anticuerpos B3 (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.242.813; ATCC HB 10573) ; KSI/4 (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4.975.369; obtenido de una célula que comprende los vectores NRRL B-18356 y/o NRRL B-18357) ; 260F9 (ATCC HB 8488) ; y D612 (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.183.756; ATCC HB 9796) . También se puede consultar el Catálogo de ATCC de cualquier año posterior para identificar otras líneas celulares adecuadas que producen anticuerpos de células anti-tumor.

Para atacar a la vasculatura del tumor, el anticuerpo objetivo o ligando frecuentemente enlazará a un marcador expresado por, adsorbido por, inducido en, o de otro modo localizado en los vasos sanguíneos intratumorales del tumor vascularizado. Las moléculas objetivo expresadas adecuadas incluyen, por ejemplo, endoglina, E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1, PSMA (Liu y otros, 1997) , un TIE, un ligando reactivo con LAM-1, un receptor VEGF/VPF, un receptor FGF, integrina $\alpha_v\beta_3$, pleyotropina y endosialina. Los objetivos adsorbidos adecuados son aquellos tales como VEGF, FGF, TGF β , HGF, PF4, PDGF, TIMP, un ligando que se enlaza con un TIE y las isoformas de fibronectina asociadas con tumores. Los antígenos naturalmente y artificialmente inducibles por citocinas y coagulantes también se pueden usar como blanco, tales como ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1, un ligando reactivo con LAM-1, endoglina, y hasta MHC Clase II (inducible por citocina, por ejemplo, mediante IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-4 y/o TNF- β) ; y E-selectina, P-selectina, PDGF e ICAM-1 (inducible por coagulante, por ejemplo, mediante trombina, Factor IX/IXa, Factor X/Xa y/o plasmina) .

Las siguientes patentes se identifican con el fin de incluso suplementar adicionalmente los presentes conocimientos con respecto a la preparación y uso de las inmunotoxinas dirigidas contra marcadores expresados, adsorbidos, inducidos o localizados de la vasculatura del tumor: Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5.855.866; 5.776.427; 5.863.538; 5.660.827; 6.004.554; 5.965.132; 6.051.230; 6.004.555; 6.093.399; 5.877.289 y 6.036.955.

Los objetivos estromales de tumor adecuados incluyen componentes de la matriz o estroma extracelular del tumor, o componentes que se enlazan en la misma; incluyendo los marcadores de membrana base, colágeno tipo IV, laminina, sulfato de heparán, proteoglicano, fibronectinas, plaquetas activadas, LIBS y tenascina. Un objetivo preferente para estos usos es RIBS.

Las siguientes patentes y solicitudes de patente se identifican con el fin de incluso suplementar adicionalmente los presentes conocimientos con respecto a la preparación y uso de agentes objetivo del estroma del tumor: Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.877.289; 6.004.555; 6.036.955 y 6.093.399.

En ciertas aplicaciones, la segunda terapéutica anticáncer consistirá en anticuerpos o ligandos acoplados operativamente a agentes citotóxicos o anticelulares que tienen la capacidad de exterminar o suprimir el crecimiento de la división celular de las células endoteliales. Se incluyen entre los agentes anticelulares adecuados los agentes quimioterapéuticos y los radioisótopos, así como las citotoxinas. Se incluyen entre los agentes quimioterapéuticos a título de ejemplo: esteroides; citoquinas; antimetabolitos, tales como citosina arabinosida, fluorouracilo, metotrexato o aminopterín; antraciclina; mitomicina C; alcaloides vinca; antibióticos; demecolcina; etoposida; mitramicina; y agentes antitumorales alquilantes, tales como clorambucil o melfalán.

En la mayor parte de aplicaciones terapéuticas combinadas serán preferentes las fracciones de toxinas debido a la capacidad mucho mayor de la mayor parte de toxinas en facilitar un efecto de exterminación de las células en comparación con otros agentes potenciales. Por lo tanto, son agentes anticelulares preferentes para segunda terapéutica las toxinas derivadas de plantas, hongos o bacterias. Se incluyen entre las toxinas a título de ejemplo las epipodofilotoxinas; endoxina bacteriana o la fracción de lípido A de la endotoxina bacteriana; proteínas de inactivación de ribosoma tales como saporina o gelonina; α -sarcina; aspergilina; restrictocina; ribonucleasas, tales como ribonucleasa placentar; toxina de la difteria y exotoxina *pseudomonas*.

Ciertas toxinas preferentes son la gelonina y las toxinas de cadena A, tales como la cadena de ricino A. La fracción de toxina más preferente es frecuentemente la cadena de ricina A que ha sido tratada para modificar o eliminar residuos de carbohidratos, que se designa cadena A deglicosilada (dgA) . La cadena A de ricina deglicosilada es preferente a causa de su extrema potencia, mayor vida media y a causa de ser económicamente factible su fabricación en calidad y escala clínica. También se puede utilizar la cadena de ricina A recombinante y/o truncada.

Otros agentes a utilizar con inmunoconjugados para el ataque de los vasos tumorales o estroma tumoral son las angiopoyetinas. Las angiopoyetinas, igual que los miembros de la familia VEGF, son factores de crecimiento ampliamente específicos para el endotelio vascular (Davis y Yancopoulos, 1999; Holash y otros, 1999) . Las angiopoyetinas que se han descrito en primer lugar eran un agonista de tipo natural, angiopoyetina-1 (Ang-1; SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2) , y un antagonista natural, angiopoyetina-2 (Ang-2; SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4) , de manera que ambos actúan por medio del receptor de quinasa tirosina de la célula endotelial, Tie2.

También se han identificado dos nuevas angiopoyetinas, angiopoyetina-3 (ratón) y angiopoyetina-4 (humana) (Valenzuela y otros, 1999) . La angiopoyetina-3 parece actuar como antagonista, mientras que la angiopoyetina-4 parece funcionar como agonista (Valenzuela y otros, 1999) . También se clonó una proteína designada como angiopoyetina-3 a partir del corazón humano y se indicó que no tenía efectos mitogénicos en las células endoteliales (Kim y otros, 1999) . También se han creado proteínas de fusión de angiopoyetina-1 y angiopoyetina-2 tal como se puede indicar como ejemplo por la proteína de fusión estable Ang-1-Ang-2 incluida en esta descripción como SEQ ID NO:5.

Si bien hay necesidad de VEGF para las etapas iniciales del desarrollo vascular, la angiopoyetina-1 se requiere de manera general para las etapas posteriores del remodelado vascular. Por lo tanto, la angiopoyetina-1 es un factor de maduración o estabilización que convierte los vasos inmaduros en vasos maduros.

Se ha demostrado que la angiopoyetina-1 aumenta la revascularización en tejidos isquémicos (Shyu y otros, 1998) incrementando la supervivencia de redes vasculares expuestas a VEGF o una forma de aFGF (Papapetropoulos y otros, 1999) . Estos autores también han demostrado que la angiopoyetina-1 impide la muerte apoptótica en HUVEC iniciada por la retirada de la misma forma de aFGF (Papapetropoulos y otros, 1999) . Estos datos son coherentes con la función directa de la angiopoyetina-1 en células endoteliales humanas y su interacción con otras moléculas angiogénicas para estabilizar estructuras vasculares al promover la supervivencia de células endoteliales diferenciadas.

La angiopoyetina-2 es un agente preferente para su utilización en terapia de combinación dirigida a un objetivo, particularmente en tumores con bajos niveles de VEGF y/o en combinación con inhibición de VEGF. La angiopoyetina-2 es también un ligando para Tie2, pero en general contrarresta la maduración/estabilidad de vasos sanguíneos mediada por angiopoyetina-1. Es, por lo tanto, un antagonista de angiopoyetina-1 y actúa alterando la estructura capilar. No obstante, dado que la angiopoyetina-2 hace las células del endotelio sensibles a estímulos angiogénicos, puede iniciar neovascularización en combinación con otras señales apropiadas, particularmente VEGF (Asahara y otros, 1998; Holash y otros, 1999) .

En ausencia de otra señal angiogénica, la angiopoyetina-2 provoca que los vasos se desestabilicen y resulten inmaduros. En presencia de un estímulo, tal como VEGF, la angiopoyetina-2 favorece la angiogénesis. Ciertamente, los efectos angiogénicos de una serie de reguladores se cree que se consiguen, por lo menos en parte, a través de la regulación de un bucle autocrino de actividad de angiopoyetina-2 en células endoteliales microvasculares (Mandriota y Pepper, 1998) .

Se ha informado de la expresión de angiopoyetina-2 en tejidos tumorales (Tanaka y otros, 1999) , en los que presumiblemente actúa en combinación con VEGF para favorecer la angiogénesis (Stratmann y otros, 1998; Holash y otros, 1999) . No obstante, dado que la angiopoyetina-2 proporciona una señal negativa cuando VEGF es reducido o ausente, la disposición de angiopoyetina-2 puede ser un enfoque terapéutico útil. La angiopoyetina-2 puede ser administrada como proteína terapéutica o a través de terapia génica (ver anterior) , o en forma dirigida a tumores. Si bien todos los tipos de constructos direccionados de angiopoyetina-2 se prevén para su utilización en aspectos de terapia de la invención, los agentes preferentes actualmente para objetivar la angiopoyetina-2 al tumor son los que se unen con aminofosfolípidos, incluyendo anticuerpos anti-PS y anexinas.

Para el tratamiento y ataque objetivado tumoral con inmunotoxinas, se han identificado las siguientes patentes con los objetivos de suplementar adicionalmente el contenido de la presente descripción con respecto a agentes

anticelulares y citotóxicos: Patentes U.S.A. N^{os}. 5.855.66; 5.776.427; 5.863.538; 5.660.827; 6.004.554; 5.965.132 y 6.051.230.

5 El segundo agente direccionado para utilización opcional con los anticuerpos antiaminofosfolípidos de la invención puede comprender también un componente direccionado que es capaz de favorecer la coagulación, es decir, un coagulando. En este caso el anticuerpo o ligando de direccionado se puede ligar de manera directa o indirecta, por ejemplo, a través de otro anticuerpo, a un factor que estimula directamente o indirectamente la coagulación.

10 Son factores de coagulación preferentes para estas aplicaciones el Factor de Tejido (TF) y derivados de TF, tales como TF truncado (tTF), TF dimérico y multimérico y TF mutante deficiente en la capacidad de activar el Factor VII. Otros factores de coagulación adecuados incluyen coagulantes dependientes de vitamina K, tales como Factor II/IIa, Factor VII/IIa, Factor IX/IXa y Factor X/Xa; factores de coagulación dependientes de la vitamina K a los que les falta la modificación Gla; activador del Factor X del veneno de la víbora de Russell; compuestos activadores de plaquetas tales como tromboxano A₂ y tromboxano A₂ sintasa; e inhibidores de fibrinólisis, tales como α₂-antiplasmina.

15 El ataque objetivado y tratamiento de tumores con coagulandos se describe en las siguientes patentes, cada uno identificado con el objetivo de suplementar adicionalmente la descripción actual con respecto a coagulandos y factores de coagulación: Patentes U.S.A. N^{os}. 5.855.866; 5.877.289; 5.965.132; 6.093.399; 6.004.554; y 6.036.955.

20 Dado que una distribución algo más amplia de un agente coagulante no se asociará con graves efectos secundarios, existe una exigencia menos estricta impuesta en el elemento de ataque objetivado de coagulandos que con respecto a inmunotoxinas. Por lo tanto, el conseguir ataque objetivo específico significa que se favorece la coagulación en los vasos del tumor con respecto a los vasos de lugares no tumorales. De este modo, el ataque objetivado específico de un coagulando es un término funcional en vez de un término puramente físico relativo a las características de biodistribución del agente de ataque objetivado. No es improbable que los objetivos útiles no estén restringidos por completo a tumores, y que los ligandos de ataque objetivado que son eficaces para ayudar a la coagulación específica de tumor, se puedan encontrar no obstante de manera segura en otros lugares del cuerpo según administración, tal como ocurre con VCAM-1.

25 La preparación de inmunotoxinas es en general bien conocida en la técnica (ver, por ejemplo, Patente U.S.A. 4.340.535). Cada una de las siguientes patentes se incorporan a la presente descripción a título de referencia con los objetivos de suplementar adicionalmente la descripción actual con respecto a la generación de inmunotoxinas, su purificación y utilización: Patentes U.S.A. N^{os}. 5.863.538; 5.660.827; 6.004.554; 5.965.132 y 6.051.230.

30 En la preparación de inmunotoxinas se pueden conseguir ventajas por la utilización de ciertos enlazadores. Por ejemplo, enlazadores que contienen un enlace bisulfuro que está estéricamente impedidoson frecuentemente preferentes, debido a su mayor estabilidad *in vivo*, impidiendo por lo tanto la liberación de la fracción de la toxina antes de unión en el lugar de acción. Es deseable de manera general tener un conjugado que permanezca intacto en las condiciones que se encuentran en general en el cuerpo excepto el lugar deseado de acción, en cuyo lugar es deseable que el conjugado tenga buenas características de liberación.

35 Dependiendo del compuesto de toxina específico utilizado, puede ser necesario disponer un separador de péptido que una operativamente el agente de ataque objetivo o de direccionado y el compuesto de toxina, de manera que el separador péptido es capaz de plegado en una estructura de bucle unido a bisulfuro. El fraccionamiento proteolítico dentro del bucle daría lugar en este caso a un polipéptido heterodimérico en el que el agente de ataque direccionado y el compuesto de toxina están enlazados solamente por un único enlace de bisulfuro.

40 Cuando se utilizan otros compuesto de toxina determinados, se puede disponer un separador péptido no divisible para unir operativamente el agente de ataque direccionado y el compuesto de toxina. Las toxinas que se pueden utilizar conjuntamente con separadores péptidos no fraccionables son las que por su parte pueden ser convertidas por fraccionamiento proteolítico, en una forma citotóxica con unión de bisulfuro. Un ejemplo de dicho compuesto de toxina es un compuesto de exotoxina *Pseudomonas*.

45 También se pueden conjugar satisfactoriamente una serie de agentes quimioterapéuticos y otros agentes farmacológicos a anticuerpos o ligandos de direccionado. Se incluyen entre los agentes antineoplásticos a título de ejemplo que se han conjugado a anticuerpos la doxorubicina, daunomicina, metotrexato y viablastina. Además, el acoplamiento de otros agentes tales como neocarzinostatina, macromicina, treninimón y α-amanitina ha sido descrito (ver Patente U.S.A. N^o. 5.855.866; y Patente N^o. 5.965.132).

55 Teniendo en cuenta los trabajos anteriores de uno de los inventores actuales, la preparación de coagulandos se lleva a cabo en la actualidad asimismo de manera fácil. La asociación operativa de uno o varios factores coagulandos por un agente de direccionado puede ser un enlace directo tal como los descritos anteriormente para las inmunotoxinas. De manera alternativa, la asociación operativa puede ser un acoplamiento indirecto, tal como aquél en el que el agente de direccionado es acoplado operativamente a una segunda región de acoplamiento, preferentemente un anticuerpo o zona de unión de antígeno de un anticuerpo, que se une al factor de coagulación. El factor de coagulación debe ser acoplado al agente de direccionado en un lugar distinto de su lugar de coagulación funcional, particularmente en el caso en el que se utiliza un enlace covalente para unir las moléculas.

Los coaguligandos enlazados indirectamente se basan muy frecuentemente en anticuerpos biespecíficos. La preparación de anticuerpos biespecíficos es también bien conocida en esta técnica. Un método de preparación comporta la preparación separada de anticuerpos que tienen carácter específico para el componente tumoral objetivo, por una parte, y el agente coaguligante por la otra. Entonces se generan fragmentos pépticos F (ab'y)₂ de los dos anticuerpos escogidos, seguido de la reducción de cada uno de ellos para proporcionar fragmentos separados Fab'y_{SH}. Los grupos SH de uno de los dos asociados a acoplar son alquilados a continuación con un reactivo de reticulación, tal como o-fenilendimaleimida, para conseguir grupos maleimida libres en un asociado. Este asociado podrá ser conjugado a continuación al otro por medio de un enlace de tioéter, proporcionando el heteroconjugado F (ab'y)₂ deseado (Glennie y otros, 1987). También se pueden llevar a cabo otros enfoques tales como la reticulación con SPDP o proteína A.

Otro método para la producción de anticuerpos biespecíficos consiste en la fusión de dos hibridomas para formar un cuadroma. Tal como se utiliza en esta descripción, el término cuadroma está destinado a describir la fusión productiva de dos hibridomas de célula B. Utilizando técnicas que actualmente son estándar, dos hibridomas productores de anticuerpos se fusionan para proporcionar células descendientes, y estas células que han mantenido la expresión de ambos conjuntos de genes del clonotipo inmunoglobulina son seleccionadas a continuación.

Un método preferente de generar un cuadroma comporta la selección de un mutante deficiente en enzima de como mínimo uno de los hibridomas parentales. Esta primera línea celular de hibridoma mutante es fusionada a continuación a células de un segundo hibridoma que ha sido expuesto de forma letal, por ejemplo, a yodoacetamida, impidiendo su supervivencia continuada. La fusión celular permite la recuperación del primer hibridoma por adquisición del gen para su deficiencia enzimática con respecto al hibridoma tratado de forma letal y recuperar el segundo hibridoma por fusión con el primer hibridoma. De manera preferente, pero no necesaria, es la fusión de inmunoglobulinas del mismo isótopo, pero de una subclase diferente. Un anticuerpo de subclase mixta permite la utilización de un ensayo alternativo para el aislamiento de un cuadroma preferente.

Las realizaciones de identificación por microtitulación, FACS, tinte por inmunofluorescencia, anticuerpos específicos de idiotipo, ensayos de competición de unión de antígeno y otros métodos comunes en la técnica de la caracterización de anticuerpos pueden ser utilizados para identificar cuadromas preferentes. Después del aislamiento del cuadroma, los anticuerpos biespecíficos son purificados separándolos de otros productos celulares. Esto se puede conseguir por una serie de procedimientos de aislamiento de anticuerpos conocidos por los técnicos en la materia de purificación de inmunoglobulinas (ver, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory and Manual, 1988). Son preferibles las columnas de sefrosa de proteína A o proteína G.

En la preparación de ambas inmunotoxinas y coaguligandos, se puede utilizar expresión recombinante. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el agente de ataque direccionado escogido, y la toxina o coagulante, son acoplados en marco en un vector de expresión. La expresión recombinante tiene como resultado la traslación del ácido nucleico para dar lugar al compuesto deseado de agente de direccionado-toxina/coagulante.

Se han identificado las siguientes patentes con el objetivo de suplementar adicionalmente la presente descripción con respecto a la preparación de coaguligandos, su purificación y utilización, utilizando coaguligandos de anticuerpos biespecíficos: Patentes U.S.A. N^{os} 5.855.866; 5.877.289; 5.965.132; 6.004.555; 6.036.955; y 6.093.399.

Las dosis efectivas de las inmunotoxinas y coaguligandos para su uso combinado con anticuerpos anti-aminofosfolípidos desnudos en el tratamiento de cáncer estarán entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg, y preferiblemente, de entre aproximadamente 0,8 mg/kg hasta aproximadamente 1,2 mg/kg, cuando se administra a través de la ruta IV a una frecuencia de aproximadamente una vez por semana. Alguna variación en dosificación necesariamente se presentará dependiendo de la condición del sujeto que se está tratando. El médico responsable de la administración determinará la dosis adecuada para el sujeto individual.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferentes de la invención. Deberá apreciarse por los expertos en la técnica, que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y por lo tanto se pueden considerar que constituyen modos preferentes para su práctica.

Ejemplo I

Expresión de VCAM-1 en el tumor y en vasos sanguíneos normales

50 A Materiales y métodos

1. Materiales

Se obtuvo Na¹²⁵I de Amersham (Arlington Heights, IL). Medio de cultivo de tejido de Dulbecco de Eagle modificado (DMEM) y solución regulada de sulfato (PBS) de Dulbecco que contenía Ca²⁺ y Mg²⁺ se obtuvieron de Gibco (Grand Island, NY). El suero de becerro fetal se obtuvo de Hyclone (Logan, Utah). El O-fenilendiamina, peróxido de hidrógeno, 3-aminopropiltriethoxi-silano y solución salina, sin endotoxina, estéril (0,9 por ciento NaCl en 100 mililitros de agua) fueron de Sigma (St. Louis, MO). SMPT fue de Pierce (Rockford, IL). Proplex T que contenía Factor VII

(74 IU/ml) , factor X y factor IX (17 IU/ml) se compró en Baxter Diagnostic Inc. (McGraw Park, IL) . Sustrato cromogénico, S-2765, para medir el factor Xa de la actividad proteolítica se obtuvo de Chromogenix (Franklin, OH) . Factor purificado Xa se compró en American Diagnostica (Greenwich, CT) . Se obtuvieron placas de microtitulación con fondo plano de 96 y 48 de Falcon (Becton Dickinson y Co., Lincoln Park, NJ) . Cuentas de sefarosa-Proteína G y Superdex S200 se compraron en Pharmacia (Piscataway, NJ) . IL-1 α murina recombinante se compró en R&D Systems (Minneapolis, MN) .

2. Anticuerpos

El hibridoma MK2.7, que secreta un anticuerpo IgG1 de rata contra VCMA-1 murino, se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD; ATCC CRL 1909) . Miyake y otros (1991) informaron sobre la caracterización de este anticuerpo anti-VCAM-1. El hibridoma R187, que secreta un anticuerpo IgG1 de rata contra la proteína viral murina p30 gag, también se obtuvo de la ATCC, y se usó como un control apareado de isotipos para el anticuerpo anti-VCAM-1.

El anticuerpo monoclonal de ratón, 10H10, contra factor de tejido humano se preparó como se describe en Morrissey y otros (1988) , y en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 08/482.369.

MECA 32, un anticuerpo de célula endotelial vascular anti-ratón, se preparó como se describe por Leppink y otros (1989) . MJ 7/18 IgG de rata, reactivo con endoglina murina, se preparó como se describe por Ge y Butcher (1994) . Los anticuerpos MECA 32 y MJ 7/18 sirvieron como controles positivos para estudios inmunohistoquímicos.

Los anticuerpos secundarios de conejo anti-rata y de rata anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) se compraron de Dako (Carpintería, CA) .

3. Purificación de anticuerpos

El hibridoma anti-VCAM-1, MK 2.7, y el hibridoma de control irrelevante R187, se cultivaron en biorreactores (Heraeus, Inc., Alemania) durante 12 días. Los sobrenadantes se centrifugaron, se filtraron a través de filtro de 0, 22 μ m y se cargaron en columnas de Sefarosa-Proteína G. Se eluyó el IgG con regulador de ácido cítrico, pH 3, 5, se dializó en PBS y se almacenó después a 4°C en la misma solución reguladora. La pureza se estimó mediante SDS-PAGE y rutinariamente fue mayor del 90 por ciento. La capacidad de enlace del anticuerpo anti-VCAM-1 purificado se valoró inmunohistoquímicamente sobre secciones congeladas de tumor L540 y mediante ensayo ELISA basada en células, usando células bEnd.3 estimuladas con IL-1 α , como se describe más adelante en la presente descripción.

4. Ratones que tienen tumor e inmunohistoquímica

Ratones machos CB17 SCID (Charles River, Wilmington, MA) que pesaban aproximadamente 25 gramos se inyectaron con 1×10^7 L540 células de linfoma de Hodgkin subcutáneamente en el flanco derecho. Los tumores se dejaron crecer hasta un tamaño de 0, 4-0, 7 cm³. Los animales se anestesiaron con metaflano y la circulación de la sangre se perfusó con solución salina heparinizada como se describe por Burrows y otros (1992) . El tumor y los órganos principales se eliminaron y se congelaron en nitrógeno líquido.

Las secciones de criostatos del tejido se cortaron, incubaron con el anticuerpo anti-VCAM-1 y se mancharon inmunohistoquímicamente para detectar VCAM-1. La IgG de rata se detectó usando IgG anti-rata de conejo conjugada con HRP seguida por el desarrollo con carbazol (Fries y otros, 1993) .

B. Resultados

Los vasos sanguíneos de los órganos principales y de un tumor de los ratones que tenían tumores de Hodgkin humanos L540 subcutáneos se examinaron inmunohistoquímicamente para la expresión de VCAM-1 usando un anticuerpo anti-VCAM-1. La expresión de VCAM-1 en los vasos sanguíneos del tumor fue más periférico que central. Sin embargo, como se demostró en el Ejemplo VI y el Ejemplo VII, el anticuerpo anti-VCAM-1 y el coagulando evidentemente se enlazaron con los vasos de transporte de sangre, como claramente se mostró por la capacidad del coagulando para detener el flujo de sangre en todas las regiones del tumor y causar la destrucción de la región intratumoral.

Sobre todo, la expresión del VCAM-1 se observó en 20-30 por ciento de los vasos sanguíneos del tumor totales manchados por el anticuerpo anti-endoglina, MJ 7/18. El manchado de VCAM-1 de los vasos del tumor se observó en gran medida en las vénulas. La expresión VCAM-1 fue similar en tumores hasta de 1.500 mm³, pero los tumores más grandes parecieron tener un manchado reducido, con 5-10 por ciento de vasos positivos MJ 7/18 que fueron positivos para VCAM-1.

La expresión vascular constitutiva del VCAM-1 se encontró en el corazón y los pulmones, tanto en animales que tenían tumor como en animales normales (Tabla 1) . En el corazón, el manchado fuerte se observó en vénulas y venas. Aproximadamente 10 por ciento de vasos positivos MECA 32 fueron positivos para VCAM-1. El manchado en el endotelio del pulmón fue débil en comparación con el corazón y el tumor, y se confinó a unos pocos vasos

sanguíneos grandes. El manchado en estroma fuerte fue observado en testículos, en donde la expresión de VCAM-1 fue estrictamente extravascular. Descubrimientos similares con respecto a la expresión de VCAM-1 constitutivos en pulmones y testículos de roedores se dieron a conocer previamente (Fries y otros, 1993) .

(Tabla pasa a página siguiente)

5 TABLA 1

Expresión de VCAM-1 en endotelio en tejidos de ratones que tienen tumores L540 y localización de anticuerpo anti-VCAM-1

Tejido	Expresión VCAM-1 ^a	Localización de Anticuerpo Anti-VCAM-1 ^b
Adrenal	- ^c	-
Cerebelo del Cerebro	-	-
Corteza Cerebral	-	-
Corazón	++	++
Riñón	-	-
Intestino Grueso	-	-
Hígado	-	-
Pulmón	+	+
Páncreas	-	-
Intestino Delgado	-	-
Bazo	-	-
Testículos	- ^d	-
Tumor de Hodgkin L540	+++	+++

^a VCAM-1 se detectó mediante anticuerpo anti-VCAM-1 seguido por IgG-HRP anti-rata.

10 ^b Localización de anticuerpo anti-VCAM-1 *in vivo* se determinó inyectando el anticuerpo, sangrando el ratón y manchando los tejidos con IgG-HRP anti-rata.

^c Intensidad del manchado se comparó con marcadores pan-endoteliales MJ 7/18 y MECA 32; - sin mancha; + débil; ++ moderado; +++ fuerte.

15 ^d No se observó expresión vascular; sin embargo, el estroma extravascular de testículos fue manchado por anticuerpo anti-VCAM-1.

Ejemplo II

Localización de anticuerpo anti-VCAM-1 in vivo

A. Métodos

20 Ratones machos CB17 SCID (Charles River, Wilmington, MA) que pesaban aproximadamente 25 gramos se inyectaron con 1×10^7 L540 de células de linfoma de Hodgkin subcutáneamente en el flanco derecho. Se dejó que los tumores crecieran a un tamaño de 0, 4-0, 7 cm³.

Los ratones se inyectaron intravenosamente con 30 µg/25 gramos de peso corporal de anticuerpo anti-VCAM-1, anticuerpo R187 o coagulandos correspondientes en 200 µl de solución salina. Dos horas después, los animales

se anestesiaron con metafeno y su circulación sanguínea se inundó con solución salina heparinizada como se describe (Burrows y otros, 1992) . El tumor y los órganos principales se eliminaron y se congelaron en nitrógeno líquido.

- 5 Cortes criostáticos de los tejidos se cortaron y luego se mancharon inmunohistoquímicamente para determinar la presencia de IgG de rata o TF. Se detectó IgG de rata usando IgG anti-rata de conejo conjugado con HRP seguido por el desarrollo con carbazol (Fries y otros, 1993) . Se detectó coaguligando usando el anticuerpo 10H10 que reconoce factor de tejido humano, seguido por IgG anti-ratón etiquetado HRP. El anticuerpo 10H10 no tuvo reacción cruzada detectablemente con factor de tejido murino (Morrissey y otros, 1988) u otras proteínas murinas.

B. Resultados

- 10 Los ratones que tenían tumores L540 subcutáneos se inyectaron intravenosamente con anticuerpo anti-VCAM-1, y dos horas después, los ratones fueron desangrados. El tumor y los órganos normales se eliminaron y secciones congeladas se prepararon y examinaron inmunohistoquímicamente para determinar la localización del anticuerpo. Cortes en serie de los tejidos se examinaron. Se detectó IgG de rata localizada mediante Ig anti-rata etiquetada con HRP; y los vasos de sangre murina se identificaron mediante anticuerpo pan-endotelial, MECA 32.
- 15 Se detectó anticuerpo anti-VCAM-1 en el endotelio del tumor, corazón y pulmón (Tabla 1) . La intensidad y el número de vasos manchados fue idéntico al de las secciones en serie de los mismos tejidos manchados directamente con anticuerpo anti-VCAM-1 (Tabla 1) . El machado fue específico, ya que no se observó manchado de endotelio en el tumor y órganos de los ratones inyectados con un anticuerpo apareado con isotipo de la especie de especificidad irrelevante, R187. No se encontró anticuerpo anti-VCAM-1 en testículos o en ningún órgano normal,
- 20 excepto el corazón y los pulmones.

Ejemplo III

Preparación de coaguligando anti-VCAM-1•tTF

- 25 Un conjugado anti-VCAM-1•tTF o coaguligando se preparó como sigue. El factor de tejido truncado (tTF) , con cisteína adicional añadida introducida en el término N (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica con Número 08/482.369) , se expresó en *E. coli* y se purificó como se describe por Stone y otros (1995) . Después de la purificación, el grupo sulfhidrido de N'-cisteína-tTF se protegió mediante la reacción con reactivo de Ellman. El derivado tTF se almacenó en volúmenes pequeños a -70°C.

- 30 Para preparar el coaguligando anti-VCAM-1, 5 mililitros de IgG anticuerpo anti-VCAM-1 (2 miligramos/mililitro) en PBS se mezclaron con 36 microlitros de SMPT (10 mM) disuelto en DMF seco y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se filtró a través de una columna de Sefadex G25 equilibrada en PBS que contenía 1 mM de EDTA. Las fracciones que contenían el anticuerpo derivado SMPT se concentraron a 4 mililitros mediante ultrafiltración en una célula Amicon equipada con 10.000 Da de filtro cortado. El derivado tTF descongelado recientemente se incubó con 30 microlitros de DTT (10 mM) en H₂O durante 10 minutos a temperatura ambiente y se filtró a través de una columna de Sefadex G25 equilibrada en PBS que contenía 1 mM de EDTA. Las fracciones
- 35 eluidas que contenían tTF reducido se concentraron mediante ultrafiltración bajo nitrógeno a un volumen final de 3 mililitros.

- 40 El tTF reducido se mezcló con anticuerpo derivado de SMPT y la mezcla se dejó reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente. Al final de la incubación, la mezcla de la reacción se resolvió mediante filtración en gel sobre una columna de Superdex S200 equilibrada en PBS. Fracciones que contenían anti-VCAM-1•tTF que tenían un M_r de 180.000 y que corresponden a una molécula de anticuerpo enlazado a una molécula de tTF se recolectó.

Ejemplo IV

Enlace de coaguligando anti-VCAM-1 con células

Endoteliales activadas

A. Métodos

- 45 1. Yodación de anticuerpo 10H10

El anticuerpo factor de tejido antihumano, 10H10, se radioetiquetó con ¹²⁵I usando Cloramina T como se describe por Bocci (1964) . La actividad específica fue aproximadamente de 10.000 cpm/μg, como se calcula a partir de las determinaciones de proteína medidas mediante un ensayo de Bradford (Bradford, 1976) .

2. Células

- 50 Células de Hodgkin L540 (L540 Cy) , derivadas de un paciente con enfermedad terminal, se prepararon como se describe en Diehl y otros (1985) , y se obtuvieron del Prof. Volker Diehl (Klinik für Innere Medizin der Universität, Köln, Alemania) . Células bEnd.3 (endotelioma de cerebro murino) se prepararon como se describe en Bussolino y

otros (1991) y Montesano y otros (1990) y se obtuvieron del Prof. Werner Risau (Max Planck Institute, Bäd Nauheim, Alemania) .

3. Cultivo de tejido

5 Las células bEnd.3 y los hibridomas se mantuvieron en DMEM suplementado con 10 por ciento de suero de becerro fetal, 2 mM L-glutamina, 2 unidades/mililitro de penicilina G y 2 µg/ml de estreptomina. Células L540 se mantuvieron en RPMI 1640 que contenían los mismos aditivos. Todas las células se subcultivaron una vez por semana. Se realizó tripsinización bEnd.3 usando 0, 125 por ciento de tripsina en solución de PBS que contenía 0, 2 por ciento EDTA. Para estudios de enlace, las células se sembraron a una densidad de 5×10^4 células/mililitro en 0, 5 mililitros de medio en placas de 48 pocillos y se incubaron durante 48-96 horas. El medio se renovó 24 horas antes de cada estudio.

4. Enlace de coaguligando con células endoteliales activadas

15 El enlace de anticuerpo anti-VCAM-1 y coaguligando con VCAM-1 en células bEnd.3 activadas se determinó usando un ensayo ELISA basado en células, como se describe por Hahne (1993) . Las células bEnd.3 se incubaron con 10 unidades/mililitro de IL-1 α durante 4 horas a 37°C en placas de microtitulación de 96 pocillos. Al final de esta incubación, el medio se reemplazó por DPBS que contenía 2 mM Ca²⁺ y Mg²⁺ y 0, 2 por ciento (peso/volumen) gelatina como una proteína portadora. El mismo regulador se usó para la dilución de anticuerpos y para el lavado de las monocapas de células entre las etapas.

20 Las células se incubaron con 4 µg/ml de conjugado anti-VCAM-1•tTf, anticuerpo anti-VCAM•1 o reactivos de control durante 2 horas, y luego se lavaron e incubaron durante 1 hora con conjugado IgG-HRP anti-rata de conejo (dilución 1:500) . Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente. Se midió la actividad HRP añadiendo O-fenilendiamina (0, 5 miligramos/mililitro) y peróxido de hidrógeno (0, 03 por ciento peso/volumen) en regulador citrato-fosfato, pH de 5, 5. Después de 30 minutos, 100 microlitros de sobrenadante se transfirieron a placas de 96 pocillos, 100 microlitros de 0, 18 M H₂SO₄ se añadieron y se midió la absorbencia a 492 nm. Cada estudio se realizó por duplicado y se repitió como mínimo dos veces.

25 5. Detección de enlace coaguligando con células endoteliales

El coaguligando anti-VCAM-1 y controles adecuados se incubaron con células bEnd.3 estimulada con IL-1 α en placas de microtitulación de 96 pocillos, como se describió anteriormente. Los coaguligandos de enlace se detectaron identificando tanto el componente de factor de tejido como el componente de IgG de rata enlazado con células bEnd.3.

30 Después de eliminar el exceso de anticuerpo no enlazado, las células se incubaron con 100 µl/pocillo de anticuerpo 10H10 etiquetado con ¹²⁵I (0, 2 µg/ml) o Ig anti-rata de conejo etiquetado con ¹²⁵I (0, 2 µg/ml) en regulador de enlace. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las células se lavaron extensamente y se disolvieron en 0, 5 M de NaOH. El volumen entero de 0, 5 mililitros se transfirió a tubos de plástico y se contó en un contador γ . Cada estudio se realizó por duplicado y se repitió como mínimo dos veces.

35 B. Resultados

La capacidad de un coaguligando anti-VCAM-1•tTF para enlazarse con células bEnd.3 murinas activadas con IL-1 α se determinó midiendo el enlace de anticuerpo anti-TF radioyodado a células tratadas con coaguligando *in vitro*. La expresión de VCAM-1 por las células bEnd.3 es inducible transitoriamente por IL-1 α con un pico de expresión VCAM-1 obtenido 4-6 horas después de la adición de la citocina (Hahne y otros, 1993) . El enlace fuerte del coaguligando con las células bEnd.3 activadas se observó (Figura 1A) .

40 En saturación, 8, 7 fmoles de anticuerpo anti-TF se enlazó a las células, lo cual es equivalente a 540.000 moléculas de anticuerpo anti-TF por célula. El enlace del coaguligando fue específico; no hubo enlace detectable sobre el fondo con un coaguligando de control apareado al isotipo de especificidad irrelevante. El enlace de coaguligando con células no estimuladas fue de aproximadamente la mitad al de las células activadas y probablemente es atribuible a la expresión de VCAM-1 constitutivo por las células de endotelioma cultivado.

50 En otros estudios, el coaguligando anti-VCAM-1•tTF se encontró que se enlaza tan fuerte como el anticuerpo anti-VCAM-1 no conjugado con células bEnd.3 activadas, usando la detección mediante IgG de anti-rata etiquetada con peroxidasa en el ensayo. Esto se hizo tanto a concentraciones de saturación como de subsaturación. Por lo tanto, el procedimiento de conjugación (Ejemplo III) no disminuyó la capacidad del anticuerpo para enlazarse con VCAM-1 en monocapas endoteliales intactas.

Ejemplo V

Activación del factor X mediante coaguligando

Enlazado con células endoteliales

A. Métodos

5 La actividad del coaguligando anti-VCAM-1•tTF enlazado con células bEnd.3 activadas se determinó indirectamente usando un ensayo cromogénico para detectar el factor Xa (Schorer y otros, 1985; Nawroth y otros, 1985 incorporadas a la presente invención como referencia) . Las células bEnd.3 estimuladas con IL-1 α y no estimuladas se incubaron con coaguligandos específicos y de control en placas de microtitulación de 96 pocillos como se describió anteriormente. Las células se lavaron con PBS que contenían 2 miligramos/mililitros de BSA y se
10 incubaron con 150 microlitros/pocillo de solución de Proplex T preparada recientemente diluida 1:20 en 50 mM Tris-HCl (pH de 8, 1) , 150 mM NaCl, 2 miligramos/mililitro de BSA (grado de cultivo de tejido, libre de endotoxinas) , y 2, 5 mM de CaCl₂. Después de la incubación durante 60 minutos a 37°C, 100 microlitros se retiraron de cada pocillo, se transfirieron a placas de 96 pocillos y se mezclaron con 100 μ l del mismo regulador que contenía 12, 5 mM de EDTA (pH 8, 1) .

15 El sustrato cromogénico S2765 para medir la actividad proteolítica del factor Xa se añadió en 50 μ l, dando una concentración final de 300 μ M. El deterioro del sustrato se determinó leyendo la absorbancia a 405 nm durante un período de 2 horas en un lector de microplacas (Molecular Devices, Palo Alto, CA) .

20 La producción del producto cromogénico fue completamente dependiente de la presencia de Proplex T y las células bEnd.3 preincubadas con el coaguligando específico. La hidrólisis del fondo del sustrato mediante Proplex T en ausencia de células fue aproximadamente del 10 por ciento del valor máximo y se sustrajo de cada determinación. Coaguligandos libres diluidos en solución de Proplex T fueron incapaces de generar factor Xa. La cantidad de Xa generado se calculó a título de referencia con una curva estándar construida con concentraciones conocidas de factor Xa purificado.

25 Al final del estudio, las células se desprendieron con tripsina-EDTA y se contaron. Los resultados se expresan como la cantidad de factor Xa generado por 10⁴ células. Cada estudio se realizó por duplicado y se repitió como mínimo 3 veces.

B. Resultados

1. Activación del factor X

30 El coaguligando anti-VCAM-1•tTF enlazado con células bEnd.3 activadas con IL-1 α fue capaz de activar específicamente el factor X. La proporción de generación del factor Xa mediante células recubiertas con anti-VCAM-1•tTF fue de 3, 2 ng por 10⁴ células por hora, lo cual es de 7 a 10 veces más alta que la que se observó con células activadas tratadas con un coaguligando de control de especificidad irrelevante o con tTF solo (Figura 1B) . El anti-VCAM-1•tTF en ausencia de células tuvo una actividad de activación del factor X indetectable, confirmando que el enlace de células es esencial para la actividad de coaguligando.

35 El anti-VCAM-1•tTF enlazado con células bEnd.3 no estimuladas activaron el factor X a una proporción de 1, 6 ng por 10⁴ células por hora. Esta proporción es de aproximadamente la mitad de la observada con las células estimuladas con IL-1 α , de acuerdo con la cantidad más baja del 50 por ciento de coaguligando que se enlaza con las no estimuladas en comparación con células estimuladas. Los resultados similares a los mostrados en la Figura 1B se obtuvieron en tres estudios por separado.

40 2. Efecto de permeabilización de células endoteliales

La permeabilización de monocapas de bEnd.3 con saponina después de tratarlas con coaguligando anti-VCAM-1•tTF aumentó la capacidad del coaguligando de enlace para activar el factor X en aproximadamente 30 veces (Tabla 2) . La proporción de la generación del factor Xa por células no estimuladas tratadas con anti-VCAM-1•tTF
45 aumentó de 1, 6 a 49, 2 ng por 10⁴ células por hora después de la permeabilización, mientras que las células estimuladas con IL-1 α aumentaron de 3, 2 a 98, 8 ng por 10⁴ células por hora. La actividad de generación del factor Xa de las células permeabilizadas debido al coaguligando de enlace en vez de al TF endógeno desde las células no tratadas permeabilizadas o células tratadas con coaguligando de control de especificidad irrelevante tuvieron una actividad de generación de factor Xa baja (2 ng por 10⁴ células por hora) .

50 Estos resultados indican que el coaguligando es capaz de funcionar más eficientemente en el ambiente de una célula permeabilizada. Posiblemente, la permeabilización expone los fosfolípidos cargados negativamente desde dentro de la célula que acelera la formación de los complejos de iniciación de la coagulación, o aún evita la inactivación de estos complejos mediante TFPI.

TABLA 2

Generación del factor Xa mediante el enlace con anti-VCAM-1•tTF con células bEnd.3 intactas o permeabilizadas (ng por 10⁴ células por 60 minutos)

Tratamiento ^a	Células			
	intactas	Permeabilizadas ^b		
	Control	IL-1 α	Control	IL-1 α
Regulador	0, 25 ^c	0, 43	0, 45	2, 0
tTF	0, 26	0, 42	0, 39	2, 1
IgG•tTF de Control	0, 26	0, 43	0, 41	2, 1
Anti-VCAM-1•tTF	1, 64	3, 17	49, 2	98, 8

Las células bEnd.3 estimuladas con IL-1 α y no estimuladas se incubaron con solución reguladora solamente o con ^a 4 μ g/ml de tTF, IgG•tTF de control o anti-VCAM-1•tTF seguido por 60 minutos de incubación con solución Proplex T a 37^oC.

^b Las células se trataron con 0, 2 por ciento de saponina 5 minutos antes de la adición de Proplex T.

Se determinó la cantidad del factor Xa como se describió anteriormente. Los resultados se expresaron como ng del ^c factor Xa generado por 10⁴ células por 60 minutos. Los valores del promedio aritmético de los pocillos por triplicado se muestran. SE fue menos de 5 por ciento de los valores promedio.

5 Ejemplo VI

Trombosis de vaso sanguíneo del tumor mediante coaguligando anti-VCAM-1

A. Métodos

Los ratones SCID que tenían tumores L540 (0, 4-0, 7 cm³) fueron inyectados intravenosamente con 40 μ g (proteína total) de anti-VCAM-1•tTF o R187•tTF. Esta dosis corresponde a 32 μ g de anticuerpo y 8 μ g de tTF. Otros animales recibieron cantidades equivalentes de anticuerpo libre, tTF libre o una mezcla de ambos. Los animales se anestesiaron 4 ó 24 horas después y sus circulaciones de sangre fueron inundadas con solución salina heparinizada. El tumor y los órganos principales fueron eliminados y se fijaron en formalina, y se sumergieron en parafina o se congelaron para crioseccionamiento. Las secciones se cortaron a través del centro del tejido o tumor. El número de vasos sanguíneos trombosados o no trombosados en 5 cortes transversales se contó. El porcentaje de vasos trombosados se calculó.

B. Resultados

1. Trombosis de vasos sanguíneos de tumor

Este estudio muestra que la administración intravenosa del coaguligando anti-VCAM-1•tTF induce la trombosis selectiva de los vasos sanguíneos del tumor, en oposición a los vasos en tejidos normales, en ratones que tenían tumores.

El coaguligando anti-VCAM-1•tTF se administró a los ratones que tenían tumores subcutáneos L540 de 0, 4 a 0, 6 centímetros de diámetro. Antes de la inyección del coaguligando, los tumores estaban sanos, teniendo una morfología uniforme, careciendo de regiones de necrosis. Los tumores se vascularizaron bien y tenían una ausencia completa de vasos trombosados espontáneamente o hemorragias. Dentro de cuatro horas de inyección de coaguligando, 40-70 por ciento de vasos sanguíneos estaban trombosados, a pesar del manchado inicial de solamente 20-30 por ciento de vasos sanguíneos de tumor mostrado en el Ejemplo I. Los vasos trombosados contenían agregados de plaquetas oclusivas, eritrocitos empacados y fibrina. En varias regiones, los vasos sanguíneos se habían roto, derramando eritrocitos en el intersticio del tumor.

A las 24 horas después de la inyección de coaguligando, los vasos sanguíneos todavía estaban ocluidos y una hemorragia extensa se había extendido en todo el tumor. Las células del tumor se habían separado unas de las otras, tenían núcleos picnóticos y estaban sufriendo citólisis. A las 72 horas, la necrosis avanzada era evidente en todo el tumor. La necrosis estaba claramente presente en la región intratumoral del tumor, en donde la expresión del VCAM-1 de los vasos no era originalmente prominente. El enlace de coaguligando evidentemente fue efectivo para cortar el flujo sanguíneo en todas las regiones del tumor, dando como resultado una destrucción del tumor extendida

ampliamente. Además, es probable que el depósito de trombina inducida de coagulando inicial diera como resultado una inducción creciente del antígeno objetivo VCAM-1 en los vasos centrales, amplificando por lo tanto el ataque y la destrucción del tumor.

5 La acción trombótica del anti-VCAM-1•tTF en los vasos del tumor fue específica del antígeno. Ninguno de los reactivos de control administrados en cantidades equivalentes (tTF solo, anticuerpo anti-VCAM-1 solo, tTF más anticuerpo anti-VCAM-1 o el coagulando de control de especificidad irrelevante) causaron trombosis (Tabla 3) .

TABLA 3 *Trombosis mediada por anti-VCAM-1•tTF en ratones que tenían tumores L540*

Tratamiento ^a	Vasos Trombosados (%) ^b		
	Tumor L540	Corazón y Pulmón	Otros Órganos
Solución Salina	0-2	0	0
tTF	0-2	0	0
Anticuerpo anti-VCAM-1	0-2	0	0
Anticuerpo anti-VCAM-1 + tTF	0-2	0	0
Control IgG•tTF	0-2	0	0
Anti-VCAM-1•tTF (< 0,3 cm ³) ^c	0-10	0	0
Anti-VCAM-1•tTF (> 0,3 cm ³)	40-70	0	0

10 ^a Los ratones que tenían tumores L540 se inyectaron intravenosamente con uno de los siguientes reactivos: solución salina; 8 microgramos de tTF no conjugado; 32 microgramos de anticuerpo anti-VCAM-1 no conjugado; mezcla de 8 microgramos de tTF y 32 microgramos de anticuerpo anti-VCAM-1; 40 microgramos de coagulando IgG•tTF de control; o 40 microgramos de coagulando anti-VCAM-1•tTF. Los animales se sacrificaron 4 horas después de la inyección. Los tejidos se eliminaron y se fijaron en formalina.

15 ^b La cuantificación histológica se realizó contando números de vasos sanguíneos trombosados en 5 cortes transversales de tejido. El número de vasos trombosados se expresa como un porcentaje de vasos totales. La gama de resultados de tres ratones es representada.

^c Ratones que tenían tumores L540 se dividieron en dos grupos (5-8 animales por grupo) que tenían tumores menores o mayores de 0,3 cm³.

2. Falta de trombosis de los vasos sanguíneos normales

20 Además de la trombosis de los vasos sanguíneos del tumor, este estudio también muestra que la administración intravenosa del coagulando anti-VCAM-1•tTF no induce trombosis de vasos sanguíneos en órganos normales.

25 A pesar de la expresión de VCAM-1 en los vasos del corazón y del pulmón de ratones que tenían tumores L540 o ratones normales (Tabla 1) , la trombosis no se presentó después de la administración del coagulando anti-VCAM-1•tTF. No se mostraron signos de trombosis, daños de tejido o morfología alterada en 25 ratones inyectados con de 5 a 45 microgramos de coagulando 4 ó 24 horas anteriormente. Había una apariencia histológica normal del corazón y pulmón de los mismos ratones que tenían trombosis de tumor grande. Todos los demás órganos principales (cerebro, hígado, riñón, bazo, páncreas, intestino, testículos) también tenían morfología no alterada.

30 Las secciones congeladas de órganos y tumores a partir de los ratones tratados con coagulando dieron patrones de manchado coincidentes cuando se desarrollaron, ya sea con anticuerpo anti-TF, 10H10, o un anticuerpo IgG anti-rata, y se confirmó que el coagulando se había localizado en los vasos en el corazón, pulmón y tumor. La intensidad de manchado fue igual al visto cuando el coagulando se aplicó directamente a las secciones a altas concentraciones seguidas por un desarrollo con anti-TF o IgG anti-rata, indicando que la saturación del enlace había sido alcanzada *in vivo*.

35 Estos estudios muestran que el enlace del coagulando con VCAM-1 en vasculatura normal en el corazón y pulmón no es suficiente para inducir trombosis, y que la vasculatura del tumor proporciona factores adicionales para soportar la coagulación.

Ejemplo VII

Destrucción del tumor in vivo mediante coaguligando anti-VCAM-1

A. Métodos

5 Ratonos machos CB17 SCID se inyectaron simultáneamente con 1×10^7 células L540 como se describió anteriormente. Cuando los tumores habían alcanzado un volumen de 0, 4-0, 6 cm^3 , los ratones fueron inyectados intravenosamente, ya sea con 20 microgramos de anti-VCAM-1•tTF, 16 microgramos de anticuerpo anti-VCAM-1, 4 microgramos de tTF, una mezcla de 16 microgramos de anticuerpo anti-VCAM-1 y 4 microgramos de tTF, 20 microgramos de IgG•tTF de control o solución salina. En algunos estudios, el tratamiento se realizó 3 veces, en los días 0, 4 y 8. Un mínimo de 8 animales se trataron en cada grupo.

10 Los animales se controlaron diariamente para las mediciones del tumor y peso corporal. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 2 cm^3 , o antes, si los tumores mostraron signos de necrosis o ulceración. El volumen del tumor se calculó de acuerdo con la fórmula $\pi/6 \times D \times d^2$, en donde D es el diámetro de tumor más grande y d es el diámetro menor del tumor. Las diferencias en proporciones de crecimiento del tumor se probaron para determinar su significación estadística usando una prueba no paramétrica (prueba de suma de gama Mann-Whitney) que no hace supuestos acerca del tamaño del tumor normalmente distribuido (Gibbons, 1976) .

B. Resultados

20 La actividad anti-tumor del coaguligando anti-VCAM-1•tTF se determinó en ratones SCID que tenían tumores de 0, 3-0, 4 cm^3 L540. El fármaco se administró intravenosamente 3 veces en intervalos de 4 días. Los resultados recopilados de 3 estudios separados se presentaron en la Figura 2 y en la Tabla 4. El volumen medio del tumor de los ratones tratados con anti-VCAM-1•tTF se redujo significativamente a los 21 días de tratamiento ($P < 0, 001$) en comparación con todos los otros grupos. Nueve de un total de 15 ratones tratados con el coaguligando específico mostraron más del 50 por ciento de reducción en el volumen del tumor. Este efecto fue específico, ya que el tTF no conjugado, el coaguligando IgG de control y la mezcla de anticuerpo anti-VCAM-1 libre y tTF no afectó el crecimiento del tumor.

25 TABLA 4 *Inhibición del crecimiento del tumor mediante el coaguligando anti-VCAM-1•tTF*

Tratamiento ^a	N	Volumen medio del tumor (mm^3) ^b		Índice de crecimiento de tumor ^c	P versus solución salina ^d
		Día 0	Día 21		
Solución salina	14	331 ± 61	2190 ± 210	6,91	-
TTF	13	341 ± 22	2015 ± 205	5,90	NS
Anti-VCAM-1	16	363 ± 24	1920 ± 272	5,28	NS
Anti-VCAM-1•tTF	13	349 ± 42	2069 ± 362	5,92	NS
IgG•tTF de control	8	324 ± 30	2324 ± 304	7,17	NS
Anti-VCAM-1•tTF	15	365 ± 28	1280 ± 130	3,50	< 0,001

30 ^a Ratonos que tenían tumores L540 se inyectaron intravenosamente con uno de los siguientes reactivos: solución salina; 8 microgramos de tTF no conjugado; 32 microgramos de anticuerpo anti-VCAM-1 no conjugado; mezcla de 8 microgramos de tTF y 32 microgramos de anticuerpo anti-VCAM-1; 40 microgramos de coaguligando IgG•tTF de control (R187) ; o 40 microgramos de coaguligando anti-VCAM-1•tTF. El tratamiento se repitió el día 4 y 7 después de la primera inyección.

^b Volumen medio del tumor ± desviación estándar.

^c El índice de crecimiento del tumor es la proporción del volumen medio del tumor en el día 21 contra el volumen medio del tumor en el día 0.

35 ^d Dos valores de P consecutivos son para diferencias en el volumen del tumor (día 21) para el grupo tratado contra el grupo de solución salina determinados mediante la prueba de la suma de gama Mann-Whitney.

Ejemplo VIII

Expresión de fosfatidilserina en vasos sanguíneos del tumor

A. Métodos

1. Anticuerpos

- 5 Los anticuerpos anti-fosfatidilserina (anti-PS) y anti-cardiolipina, ambos anticuerpos IgM monoclonales de ratón, se produjeron como se describe por Rote (Rote y otros, 1993) . Los detalles de la caracterización de los anticuerpos anti-PS y anti-cardiolipina también se dieron a conocer por Rote y otros (1993) .

2. Detección de la expresión de PS en endotelio vascular

- 10 Ratones que tenían tumores L540 se inyectaron intravenosamente con 20 microgramos, ya sea de anticuerpo anti-PS o anticuerpo IgM de anti-cardiolipina de ratón. Después de 10 minutos, los ratones se anestesiaron y sus circulaciones sanguíneas fueron inundadas con solución salina heparinizada. Los tumores y los tejidos normales se eliminaron y se congelaron. Las secciones en serie de órganos y tumores se mancharon, ya sea con IgM anti-ratón etiquetada con HRP para la detección del anticuerpo anti-PS o con anticuerpo anti-VCAM-1 seguido por Ig anti-rata etiquetada con HRP.

- 15 Para preservar los fosfolípidos de membrana en secciones congeladas, se desarrolló el siguiente protocolo. Los animales se inundaron con DPBS que contenía 2, 5 mM Ca^{2+} . Los tejidos se montaron en porta-objetos recubiertos con 3-aminopropiltriethoxisilano y se mancharon dentro de 24 horas. No se usaron solventes orgánicos, formaldehído ni detergentes para la fijación o lavado de los porta-objetos. Los porta-objetos se rehidrataron mediante DPBS que contenía 2, 5 mM Ca^{2+} y 0, 2 por ciento de gelatina. La misma solución se usó para lavar secciones para eliminar el exceso de reactivos. Las secciones se incubaron con IgM anti-ratón etiquetada con HRP durante 3, 5 horas a temperatura ambiente para detectar IgM anti-PS.

B. Resultados

- 25 Para explicar la falta de efecto trombotico de anti-VCAM-1•tTF en la vasculatura positiva VCAM-1 en corazón y pulmones, los inventores desarrollaron un concepto de localización de PS diferencial entre los vasos sanguíneos normales y de tumor. Específicamente, lanzaron la hipótesis de que las células endoteliales en los tejidos normales segregan PS a la superficie interna de la bicapa de fosfolípido de la membrana de plasma, en donde es incapaz de participar en reacciones tromboticas; mientras que las células endoteliales en los tumores translocalizan PS a la superficie externa de la membrana de plasma, en donde puede soportar la acción de coagulación del coagulando. La expresión de PS sobre la superficie de la célula permite la coagulación, debido a que permite la unión de factores de coagulación a la membrana y coordina el ensamble de los complejos de inicio de coagulación (Ortel y otros, 1992) .

- 35 El modelo de los inventores de la translocalización de PS en la superficie de las células endoteliales de los vasos sanguíneos del tumor, como se desarrolla en la presente descripción, es sorprendente, porque la expresión de PS no ocurre después, y no dispara inevitablemente, la muerte celular. La expresión de PS en la superficie de la célula endotelial del tumor es por lo tanto suficientemente estable para permitir que PS sirva como una entidad objetivo para la intervención terapéutica.

- 40 Para confirmar la hipótesis de que el endotelio del vaso sanguíneo del tumor expresa PS sobre la superficie luminal de la membrana del plasma, los inventores usaron inmunohistoquímica para determinar la distribución del anticuerpo anti-PS después de la inyección intravenosa en ratones que tenían tumores L540. El anticuerpo anti-PS localizó dentro de 10 minutos a la mayoría de los vasos sanguíneos del tumor, incluyendo los vasos en la región central del tumor que carecen de VCAM-1. Los vasos que eran positivos para VCAM-1 también fueron positivos para PS. Por lo tanto, hay una expresión coincidente para PS en los vasos que expresan VCAM-1 en tumores.

- 45 En los estudios de localización *in vivo*, ninguno de los vasos en órganos normales, incluyendo la vasculatura positiva para VCAM-1 del corazón y pulmón, se mancharon, indicando que PS está ausente de la superficie externa de las células endoteliales. En cambio, cuando las secciones en tejidos normales y tumores se mancharon directamente con anticuerpo anti-PS *in vitro*, no hubo diferencias visibles entre los tipos de células normales y de tumor, endoteliales u otras, mostrando que PS está presente dentro de estas células, pero solamente se expresa en la superficie de células endoteliales en tumores.

- 50 La especificidad de la detección de PS fue confirmada por dos estudios independientes. Primero, un anticuerpo monoclonal IgM de ratón dirigido contra un lípido cargado negativamente diferente, cardiolipina, no llegó al tumor o a ningún órgano *in vivo*. Segundo, el pretratamiento de secciones congeladas con acetona abolió el manchado con anticuerpo anti-PS, presumiblemente debido a que extrajo los lípidos junto con el anticuerpo anti-PS de enlace.

Ejemplo IX

Activación del coagulando de bloques de anexina V del factor X *in vitro*

A. Métodos

La capacidad de Anexina V para afectar la formación del Factor Xa inducida por coagulando fue determinada por un ensayo cromogénico descrito anteriormente en el Ejemplo V. Células bEnd.3 estimuladas con IL-1 α se incubaron con anti-VCAM-1-tTF y se permeabilizaron mediante saponina. Se añadió Anexina V a concentraciones variantes desde 0, 1 a 10 μ g/ml, y las células se incubaron durante 30 minutos antes de la adición de Proplex T diluido. La cantidad de Factor Xa generado en la presencia o ausencia de Anexina V se determinó como se describe en el Ejemplo V. Cada tratamiento se realizó por duplicado y se repitió como mínimo dos veces.

B. Resultados

La necesidad de la expresión de PS de superficie en la acción de coagulando se indica además por el descubrimiento de los inventores de que la Anexina V, que se enlaza con PS con alta afinidad, bloquea la capacidad del enlace anti-VCAM-1-tTF con las células bEnd.3 para generar el Factor Xa *in vitro*.

La Anexina V añadida a células permeabilizadas preincubadas con anti-VCAM-1-tTF inhibió la formación del Factor Xa de una manera dependiente de la dosis (Figura 3). En ausencia de Anexina V, el coagulando enlazado con célula produjo 95 ng de Factor Xa por 10.000 células por 60 minutos. La adición de cantidades crecientes de Anexina V (en la gama de microgramo por mililitro) inhibió la producción del Factor Xa. A 10 μ g por mililitro, la Anexina V inhibió la producción del Factor Xa en 58 por ciento (Figura 3). No se observó inhibición adicional aumentando la concentración de Anexina V durante el ensayo, indicando que Anexina V saturó todos los sitios de enlace disponibles a 10 microgramos por mililitro.

Ejemplo X

Actividad de coagulando de bloques de Anexina V in vivo

A. Métodos

La capacidad de Anexina V para inhibir la trombosis inducida por coagulando *in vivo* fue examinada en ratones SCID que tenían tumores L540 de Hodgkin. Los tumores se hicieron crecer en los ratones como se describió anteriormente en el Ejemplo II. Dos ratones por grupo (tamaño de tumor 0, 5 centímetros de diámetro) se inyectaron intravenosamente a través de la vena de la cola con uno de los siguientes reactivos: a) solución salina; b) 100 microgramos de Anexina V; c) 40 microgramos de anti-VCAM-1-tTF; d) 100 microgramos de Anexina V seguido de 2 horas después por 40 microgramos de anti-VCAM-1-tTF.

Cuatro horas después de la última inyección, los ratones se anestesiaron y se inundaron con solución salina heparinizada. Los tumores se eliminaron, se fijaron con 4 por ciento de formalina, se sumergieron en parafina y se mancharon con hematoxileno-eosina. El número de vasos sanguíneos trombosados y no trombosados se contó, y el porcentaje de trombosis se calculó.

B. Resultados

Anexina V también bloquea la actividad del coagulando anti-VCAM-1-tTF *in vivo*. Grupos de ratones que tenían tumores se trataron con uno de los reactivos de prueba o de control, como se describe en los métodos. A los ratones se les dio (a) solución salina; (b) 100 microgramos de Anexina V; (c) 40 microgramos de coagulando anti-VCAM-1-tTF; o (d) 100 microgramos de Anexina V seguido dos horas después por 40 microgramos de coagulando anti-VCAM-1-tTF. Se obtuvieron resultados idénticos en ambos ratones por grupo.

No se observó ninguna trombosis espontánea, hemorragias ni necrosis en tumores derivados de los ratones inyectados con solución salina. El tratamiento con Anexina V sola tampoco alteró la morfología del tumor.

De acuerdo con otros datos presentados en la presente descripción, 40 microgramos de coagulando anti-VCAM-1-tTF causó trombosis en 70 por ciento de los vasos sanguíneos del tumor totales. La mayoría de vasos sanguíneos se ocluyeron con eritrocitos y coágulos empacados, y las células del tumor se separaron entre sí. Ambos efectos anti-tumor inducidos por coagulando, es decir, la trombosis intravascular y los cambios en la morfología de las células del tumor, se abolieron completamente pre-tratando los ratones con Anexina V.

Estos descubrimientos confirman que los efectos anti-tumor de los coagulandos son mediados a través del bloqueo de la vasculatura del tumor. Estos datos también demuestran que la PS es esencial para la trombosis inducida por coagulando *in vivo*.

Ejemplo XI

La fosfatidilserina externalizada es un marcador global de los vasos sanguíneos del tumor

A. Métodos

5 La exposición de PS en el endotelio vascular normal y de tumor se examinó en tres modelos de tumores de animales: linfoma de Hodgkin L540, carcinoma de pulmón de célula no pequeña NCI-H358, y adenocarcinoma de colon HT 29 (ATCC) . Para cultivar los tumores *in vivo*, se inyectaron 2×10^6 células en el flanco derecho de los ratones SCID y se dejaron alcanzar 0, 8-1, 2 centímetros de diámetro. Los ratones que tenían tumores grandes (volumen de aproximadamente 800 mm^3) se inyectaron intravenosamente a través de la vena de la cola con 20 microgramos de anticuerpos anti-PS o anti-cardiolipina. El anticuerpo de anti-cardiolipina sirvió como un control para todos los estudios, ya que ambos anticuerpos se dirigen contra lípidos cargados negativamente, y pertenecen a la misma clase de inmunoglobulinas (IgM de ratón) .

10 Una hora después de la inyección, los ratones se anestesiaron y su circulación de sangre se inundó con solución salina heparinizada. Los tumores y órganos normales se eliminaron y se congelaron. Las secciones congeladas se mancharon con conjugado de peroxidasa IgM anti-ratón (Jackson Immunoresearch Labs) seguido por el desarrollo con carbazol.

B. Resultados

15 Los anticuerpos anti-PS específicamente se alojaron en la vasculatura de los tres tumores (HT 29, L540 y NCI-H358) *in vivo*, como se indica por la detección del IgM de ratón. Los porcentajes promedio de los vasos manchados en los tumores fue del 80 por ciento para HT 29, 30 por ciento para L540, y 50 por ciento para NCI-H358. Los vasos en todas las regiones de los tumores se mancharon y hubo manchado tanto de capilares pequeños como de vasos grandes.

20 No se observó manchado de vasos con anticuerpos anti-PS en ningún tejido normal. En el riñón, los túbulos se mancharon tanto con anti-PS como con anti-CL, y esto probablemente se relaciona a la secreción de IgM por este órgano (Tabla 5) . Los anticuerpos anti-cardiolipina no se detectaron en ningún tumor o tejido normal, excepto en el riñón.

Estos descubrimientos indican que solamente el endotelio del tumor expone PS al sitio externo de la membrana del plasma.

25

TABLA 5 Localización de vasos de anticuerpos Anti-PS y Anti-Cardiolipina en ratones con tumor*

Tejido	Anti-PS†	Anti-Cardiolipina‡
Tumor Cy L540	++	-
Tumor H358	++	-
Tumor HT29	+++	-
Adrenal	-	-
Cerebelo cerebral	-	-
Corteza cerebral	-	-
Corazón	-	-
Riñón	-‡	-‡
Intestino grueso	-	-
Hígado	-	-
Pulmón	-	-
Páncreas	-	-
Intestino delgado	-	-
Bazo	-	-
Testículos	-	-

* La biodistribución en órganos normales, tanto de anticuerpos anti-PS como anti-cardiolipina fue idéntico en los tres modelos de animales de tumor.

5 † Los anticuerpos anti-PS y anti-cardiolipina se detectaron en secciones congeladas usando conjugado IgM-peroxidasa anti-ratón. - no manchado; + débil; ++ moderado; +++ fuerte, equivalente a marcador pan endotelial Meca 32.

‡ El manchado tubular se observó en los riñones tanto de receptores anti-PS como anti-CL.

10 Para estimar el tiempo en el cual la vasculatura del tumor pierde la capacidad para segregar PS al lado interno de la membrana, los inventores examinaron la localización de anti-PS en tumores L540 que varían en volumen de 140 a 1.600 mm³. Los ratones se dividieron en 3 grupos de acuerdo con su tamaño de tumor: 140-300, 350-800 y 800-1.600 mm³. El anticuerpo anti-PS no se detectó en tres ratones que tenían tumores pequeños L540 (hasta de 300 mm³). En anticuerpo anti-PS localizado en 3 animales de 5 en el grupo de tumores de tamaño intermedio L540 y en todos los ratones (4 de 4) que tenían tumores grandes L540 (Tabla 6). El porcentaje de vasos sanguíneos positivos a PS del total (identificados por el marcador pan endotelial Meca 32) fue de 10-20 por ciento en el grupo intermedio
15 L540 y 20-40 por ciento en el grupo de tumores grandes L540 (Tabla 6).

TABLA 6 Externalización de PS detectado en tumores de tamaño mediano y grande

Tamaño de Tumor (mm ³)	Número de Tumores Porcentaje de Vasos	
	Positivos/Total*	Positivos-PS/Total\dagger
250-800	3/5	10-20
850-1.600	4/4	20-40

Los ratones que tenían tumores L540 Cy se dividieron en tres grupos de acuerdo con el tamaño del tumor. 20 * microgramos de anticuerpos anti-PS se inyectaron intravenosamente y se permitió que circularan durante 1 hora. Los anticuerpos de ratón se detectaron en secciones congeladas usando conjugado peroxidasa IgM anti-ratón.

Número total de vasos sanguíneos se determinó usando anticuerpo pan endotelial Meca 32. Los vasos positivos † PS y positivos Meca se contaron en 4 campos por corte transversal del tumor. La gama de porcentaje de vasos positivos PS dentro del mismo grupo se muestra.

Ejemplo XII

Efectos anti-tumor de anticuerpos anti-fosfatidilserina

5 A. Métodos

Los efectos de anticuerpos anti-PS se examinaron en modelos de tumor singeneicos y xenogeneicos. Para el modelo singeneico, se inyectaron 1×10^7 células de carcinoma colorrectal murino Colo 26 (obtenido del Dr. Ian Hart, ICRF, Londres) subcutáneamente en el flanco derecho de ratones Balb/c. En el modelo xenogeneico, un xenoinjerto de linfoma de Hodgkin humano L540 se estableció inyectando 1×10^7 células subcutáneamente en el flanco derecho de ratones machos CB17 SCID. Los tumores se dejaron crecer a un tamaño de aproximadamente 0, 6-0, 9 cm³ antes del tratamiento.

Los ratones que tenían tumor (4 animales por grupo) se inyectaron intraperitonealmente con 20 microgramos de anticuerpo anti-PS natural (IgM), IgM de ratón de control o solución salina. El tratamiento se repitió 3 veces con un intervalo de 48 horas. Los animales se supervisaron diariamente para mediciones del tumor y peso corporal. El volumen del tumor se calculó como se describe en el Ejemplo VII. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron 2 cm³, o antes, si los tumores mostraron signos de necrosis o ulceración.

B. Resultados

El crecimiento tanto de tumores singeneicos como xenogeneicos se inhibió efectivamente mediante tratamiento con anticuerpos anti-PS naturales (Figura 4A y Figura 4B). Los anticuerpos anti-PS causaron daño vascular del tumor, acompañado por trombosis, y necrosis del tumor. La presencia de coágulos y desintegración de masas de tumor rodeando vasos sanguíneos bloqueados fue evidente.

Cuantitativamente, el tratamiento de anticuerpo anti-PS natural inhibió el crecimiento de tumor hasta en 60 por ciento del volumen del tumor de control en los ratones que tenían tumores grandes Colo 26 (Figura 4A) y L540 (Figura 4B). 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-PS, con los órganos normales preservando la morfología sin alterar, indistinguible de los ratones no tratados o tratados con solución salina.

La regresión del tumor comenzó 24 horas después del primer tratamiento y los tumores continuaron declinando de tamaño durante los siguientes 6 días. Esto se observó tanto en modelos de tumor singeneicos como inmunocomprometidos, indicando que el efecto fue mediado por el mecanismo o los mecanismos independientes del estado inmune. Más aún, la declinación en la carga del tumor se asoció con el aumento de apariencia de alerta y apariencia generalmente saludable de los animales, en comparación con los ratones de control que tenían tumores más grandes de 1.500 mm³. El recrecimiento del tumor se presentó 7-8 días después del primer tratamiento.

Los resultados obtenidos con tratamiento anti-PS de tumores L540 fueron más fuertes por las siguientes razones. Notablemente, la necrosis del tumor observada en el tratamiento del tumor L540 se presentó a pesar del hecho de que el porcentaje de vasos que se mancharon positivos para PS en los tumores L540 fue menor que en los tumores HT 29 y NCI-H358. Esto implica que aún más rápida la necrosis probablemente resultaría cuando se trataron otros tipos de tumor. Además, los tumores L540 generalmente se eligieron como un modelo experimental, debido a que demostraron secciones histológicas limpias, y de hecho, se sabe que son resistentes a la necrosis.

Ejemplo XIII

Efectos anti-tumor en conjugados de anexina

El descubrimiento sorprendente de que los aminofosfolípidos son marcadores estables de la vasculatura del tumor, también significa que las formaciones de agente terapéutico-anticuerpo se pueden usar en el tratamiento del cáncer.

- 5 Además de usar anticuerpos como agentes objetivos, los inventores razonaron que las anexinas, y otras proteínas de enlace con aminofosfolípidos, podrían también usarse para administrar específicamente agentes terapéuticos en la vasculatura del tumor. Los siguientes datos muestran los efectos anti-tumor que son resultado de la administración *in vivo* de formaciones anexina-TF.

A. Métodos

- 10 Un conjugado de anexina V-tTF se preparó y administró a ratones nu/nu con tumores sólidos. Los tumores se formaron de células de carcinoma colorrectal HT29 humanos que formaron tumores de como mínimo aproximadamente 1, 2 cm³. El coagulando anexina V-tTF (10 microgramos) se administró intravenosamente y se dejó circular durante 24 horas. Los ratones tratados con solución salina se mantuvieron por separado como animales de control. Después de un día de período de tratamiento, los ratones se sacrificaron y se desangraron, y los tumores y órganos mayores se cosecharon para su análisis.

B. Resultado

- 20 El conjugado de Anexina V-tTF se encontró que induce coagulación de vasos sanguíneos de tumor específicos en ratones que tienen tumor HT29. Aproximadamente el 55 por ciento de los vasos sanguíneos del tumor en los animales tratados con conjugado de Anexina V-tTF fueron trombosados después de una sola inyección. En cambio, hubo una evidencia mínima de trombosis en la vasculatura de tumor de los animales de control.

Ejemplo XIV

Translocalización de fosfatidilserina en el ambiente del tumor

- 25 El descubrimiento de PS como un marcador superficial *in vivo* único de las células endoteliales vasculares del tumor incitó a los inventores a investigar adicionalmente el efecto de un ambiente de tumor en la traslocalización de PS y la expresión de membrana externa. El presente ejemplo muestra que exponiendo las células endoteliales *in vitro* a ciertas condiciones que imitan las de un tumor, se duplica la expresión superficial de PS observado en células viables, intactas.

A. Métodos

- 30 Las células endoteliales bEnd.3 de ratón se sembraron a una densidad inicial de 50.000 células por pocillo. Veinticuatro horas después las células se incubaron con concentraciones crecientes de H₂O₂ (de 10 μM hasta 500 μM) durante 1 hora a 37°C o se dejaron sin tratar. Al final de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS que contenía 0, 2 por ciento de gelatina y se fijaron con 0, 25 por ciento de glutaraldehído. Se mancharon pocillos idénticos con IgM anti-PS o con tripsinizada y se evaluaron para determinar su viabilidad mediante la prueba de exclusión de Azul Triptano. Para el manchado anti-PS, después de bloquearlo con 2 por ciento de gelatina
- 35 durante 10 minutos, las células se incubaron con 2 microgramos/mililitro de anticuerpo anti-PS, seguido por la detección con conjugado IgM-HRP anti-ratón.

- Los pocillos sembrados con células endoteliales bEnd.3 de ratón también se incubaron con diferentes efectores y se compararon con el control, con pocillos no tratados después del mismo período de incubación a 37°C. El panel de efectores probado incluyó TNF, LPS, bFGF, IL-1α, IL-1β y trombina. Después de la incubación, las células se lavaron y fijaron, y nuevamente se mancharon ya sea con IgM anti-PS o se evaluaron para determinar su viabilidad usando la prueba de exclusión de Azul Triptano, como se ha descrito anteriormente.

B. Resultados

1. Inducción PS mediante H₂O₂

- 45 La exposición de células endoteliales a H₂O₂ a concentraciones mayores de 100 μM causó la traslocalización PS en aproximadamente el 90 por ciento de las células. Sin embargo, esto fue acompañado por desprendimiento de las células del sustrato y la viabilidad de las células disminuyó hasta aproximadamente 50-60 por ciento. La asociación de la expresión de PS de superficie con la viabilidad de células decreciente es entendible, aunque todavía es interesante notar que aproximadamente 90 por ciento de la translocalización de PS se observa con solamente una disminución del 50-60 por ciento en la viabilidad de las células.

- 50 Usando concentraciones de H₂O₂ menores de 100 μM dio como resultado una expresión de PS significativa sin ninguna reducción apreciable en la viabilidad de las células. Por ejemplo, se detectó PS en la superficie celular de aproximadamente 50 por ciento de células en todos los pocillos tratados con H₂O₂, usando H₂O₂ a concentraciones tan bajas como de 20 μM. Es importante notar que, bajo estas concentraciones bajas de H₂O₂, las células

permanecieron firmemente unidas al plástico y entre sí, no mostraron cambios morfológicos y no tuvieron signos de citotoxicidad. Análisis detallados revelaron esencialmente el 100 por ciento de contacto célula-célula, retención de la forma de célula adecuada y un citoesqueleto intacto.

5 El 50 por ciento de la expresión superficial de PS inducido por niveles bajos de H₂O₂ se observó de esta manera en poblaciones de células, en las cuales la viabilidad de las células fue idéntica a las células no tratadas, de control (es decir, 95 por ciento) . La expresión de PS asociada con concentraciones altas de H₂O₂ fue acompañada por daño celular, y las células positivas PS expuestas a más de 100 µM H₂O₂ fueron desprendidas, flotando y tuvieron citoesqueletos rotos.

10 El mantenimiento de la viabilidad de las células en presencia de concentraciones bajas de H₂O₂ es consistente de datos de otros laboratorios. Por ejemplo, Schorer y otros (1985) mostraron que las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tratadas con 15 µM de H₂O₂ promediaron 90 a 95 por ciento de viabilidad (dado a conocer como daño de 5 por ciento a 10 por ciento) , mientras que aquellas expuestas a 1500 µM de H₂O₂ solamente fueron del 0 por ciento al 50 por ciento viable (dañadas del 50 por ciento al 100 por ciento) .

15 El uso de H₂O₂ para imitar el ambiente de tumor *in vitro* también es adecuado porque el ambiente del tumor es rico en células inflamatorias, tales como macrófagos, PMN y granulocitos, que producen H₂O₂ y otras especies de oxígeno reactivo. Aunque nunca antes se conectó con marcadores vasculares de tumor estables, las células inflamatorias se sabe que median el daño celular endotelial por mecanismos que comprenden especies de oxígeno reactivas que requieren la presencia de H₂O₂ (Weiss y otros, 1981; Yamada y otros, 1981; Schorer y otros, 1985) .
20 De hecho, los estudios han mostrado que la estimulación de PMN *in vitro* produce concentraciones de H₂O₂ suficientes para causar daño celular endotelial subletal sin causar muerte celular (medido por ensayos de liberación de cromo) o desprendimiento celular; y que estas concentraciones de H₂O₂ son alcanzables localmente *in vivo* (Schorer y otros, 1985) .

25 Los datos de translocalización *in vitro* presentes se correlacionan con resultados anteriores que muestran que los anticuerpos anti-PS se localizan específicamente en células endoteliales vasculares del tumor *in vivo*, y no se enlazan con células en tejidos normales. El descubrimiento de que las concentraciones del tipo *in vivo* de H₂O₂ inducen la traslocalización de PS a la superficie de células endoteliales sin interrumpir la integridad de la célula tiene implicaciones importantes además de validar los datos *in vivo* originales y los enfoques terapéuticos de los inventores.

30 Las células endoteliales humanas, bovinas y murinas se sabe que son negativas a PS bajo condiciones normales. Cualquier expresión de PS documentada previamente siempre se ha asociado con daño celular y/o muerte celular. Esto simplemente no es el caso en los estudios presentes, en donde se mantiene la viabilidad normal. Esto muestra que la traslocalización de PS en endotelio vascular del tumor está mediado por mecanismos bioquímicos no conectados con daño celular. Se cree que es la primera demostración de la expresión superficial de PS en células
35 endoteliales intactas morfológicamente y la primera indicación de que la expresión de PS se puede desconectar de la trayectoria o las trayectorias de apoptosis. Volviendo a la operabilidad de la presente invención, estas observaciones nuevamente confirman que PS es un marcador sostenible, en vez de transitorio, de los vasos sanguíneos del tumor y un candidato adecuado para la intervención terapéutica.

2. Expresión de PS no se correlaciona con la activación celular

40 La importancia de este dato *in vitro* para el ambiente del tumor también es reforzado por el hecho de que otros activadores de células en general no tienen efectos sobre la traslocalización de PS en células endoteliales. Por ejemplo, los inventores probaron TNF en estudios similarmente controlados y encontraron que es incapaz de inducir la expresión superficial de PS, a pesar de que los aumentos esperados en la expresión de E-selectina y VCAM. Igualmente, LPS, bFGF, IL-1α e IL-1β no tuvieron efecto en la expresión de PS en estudios adecuadamente controlados.

45 3. Inducción de PS mediante trombina

En contraste con la falta de efectos de otros activadores celulares, la trombina se observó que aumenta la expresión de PS, aunque no al mismo grado que el H₂O₂. Estos datos son parte integral del modelo de inducción de tumor de la expresión de PS desarrollada por los presentes inventores (la expresión superficial de PS inducida por trombina en tejidos normales también aumentaría la coagulación ya que la expresión de PS coordina el ensamble de
50 complejos de inicio de coagulación (Ortel y otros, 1992)) .

El ambiente del tumor se sabe que es protrombótico, de manera que la vasculatura del tumor está predispuesta a la coagulación (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 5.877.289) . Como la trombina es un producto de la cascada de coagulación, está presente en la vasculatura del tumor. De hecho, la presencia de trombina induce la expresión de VCAM, contribuyendo a la capacidad de los inventores para explotar la VCAM como un marcador
55 dirigible de la vasculatura del tumor (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica números 5.855.866; 5.877.289) . Los presentes datos que muestran que la trombina también induce la expresión de PS es, por lo tanto, tanto relevante para el ataque de aminofosfolípidos a anticuerpos naturales como conjugados terapéuticos, y además explica los efectos benéficos del coagulando anti-VCAM que contiene el Factor de Tejido (Ejemplo VII) .

Todos los compuestos y métodos dados a conocer y reivindicados en esta invención se pueden realizar y llevar a cabo sin experimentación indebida basándose en la presente descripción.

Referencias

- Las siguientes referencias, en la medida en que proporcionan detalles de procedimiento a título de ejemplo u otros detalles suplementarios a los que se han indicado, se incorporan de manera específica en esta descripción a título de referencia.
- Abrams y Oldham**, In: *Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer*, Foon y Morgan (Eds.) , *Martinus Nijhoff Publishing*, Boston, pp. 103-120, 1985.
- Antibodies: A Laborator y Manual, Cold Spring Harbor Laborator y , 1988.
- Asahara, Chen, Takahashi, Fujikawa, Kearney, Magner, Yancopoulos, Isner**, Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization *Circ. Res.*, 83 (3) :233-40, 1988.
- 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.
- Berard, Boffa, Karmochkine, Aillaud, Juhan-Vague, Frances, Cacoub, Piette, Harle**, Plasma reactivity to hexagonal II phase phosphatidylethanolamine is more frequently associated with lupus anticoagulant than with antiphosphatidylethanolamine antibodies, *J. Lab. Clin. Med.*, 122 (5) :601-605, 1993.
- Berman, Mellis, Pollock, Smith, Suh, Heinke, Kowal, Surti, Chess, Cantor**, y otros, Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus, *EMBO J.*, 7 (3) :727-738, 1988.
- Bevers, Comburius, Zwaal**, The nature of the binding site for prothrombinase at the platelet surface as revealed by lipolytic enzymes, *Eur. J. Biochem.*, 122:81-85, 1982.
- Bevers, Comfurius, Zwaal**, Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation, *Biochim. Biophys. Acta*, 736:57-66, 1983.
- Bevers, Rosing y Zwaal**, Development of procoagulant binding sites on the platelet surface, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 192:359-371, 1985.
- Bevers, Galli, Barbui, Comfurius y Zwaal**, Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin, *Thromb. Haemost.*, 66 (6) :629-32, 1991.
- Bevilacqua**, Endothelial-leukocyte adhesion molecules, *Ann. Rev. Immunol.*, 11:767-804, 1993.
- Blankenberg, Katsikis, Tait, Davis, Naumovski, Ohtsuki, Kopiwoda, Abrams, Darkes, Robbins, Maecker and Strauss**, In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95:6349-6354, 1998.
- Bocci**, Efficient labeling of serum proteins with ¹³¹I using chloramine T, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 15:449-456, 1964.
- Bombeli, Karsan, Tait y Harlan**, Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant, *Blood*, 89 (7) :2429-2442, 1997.
- Bordron, Dueymes, Levy, Jamin, Leroy, Piette, Schoenfeld y Youinou**, The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis, *J. Clin. Invest.*, 101 (10) :2029-2035, 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.
- 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 y Scott**, Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine, *Clin. Immun. Immunopathol.*, 42:63-75, 1987.
- Brinkman, Mertens, Holthuis, Zwart-Huinink, Grijm y Van Mourik**, The activation of human blood coagulation factor X on the surface of endothelial cells: a comparison with various vascular cells, platelets and monocytes, *Br. J. Haematol.*, 87:332-342, 1994.

- Bruijn y 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 y otros**, Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors, *Science*, 236, 806-812, 1987.
- 5 **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.
- Burrows, Watanabe, Thorpe**, A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors, *Cancer Res.*, 52:5954-5962, 1992.
- 10 **Bussolino, deRossi, Sica, Colotta, Wang, Bocchietto, Martin, Padura, Bosia, Dejana, Mantovani**, Murine endothelial cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines, *J. Immunol.*, 147:2122-2129, 1991.
- Campbell**, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laborator y Techniques in Biochemistr y and Molecular Biology*, Vol. 13, *Burden y Von Knippenberg (Eds.)*, Elsevier, Amsterdam, pp. 75-83, 1984.
- 15 **Carnemolla y otros**, A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors, *J. Cell Biol.*, 108:1139-1148, 1989.
- Chamley, McKay, Pattison**, Cofactor dependent and cofactor independent anticardiolipin antibodies, *Thromb. Res.*, 61 (3) :291-299, 1991.
- Clapp y otros**, The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis, *Endocrinology*, 133 (3) :1292-1299, 1993.
- 20 **Connor, Bucana, Fidler, Schroit**, Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (9) :3184-3188, 1989.
- Coughlin y otros**, Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis, *J. Clin. Invest.*, 101 (6) :1441-1452, 1998.
- 25 **Dachar y -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 y otros**, Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 (9) :4082-4085, 1994.
- D'Angelo y otros**, Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillar y endothelial cells in inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (14) :6374-6378, 1995.
- 30 **Davis y Yancopoulos**, The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 237:173-85, 1999.
- De Jong, Geldwerth, Kuypers**, Oxidative damage does not alter membrane phospholipid asymmetr y in human er y throcytes, *Am. Chem. Soc.*, 1997.
- 35 **Denekamp**, Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer, *Cancer Metastasis Rev.*, 9:267-282, 1990.
- DeVore y otros**, Phase I Study of the Antineovascularization Drug CM101, *Clin. Cancer Res.*, 3 (3) :365-372, 1997.
- Diehl, Pfreundschuh, Fonatsch, Stein, Falk, Burcher, Schaadt**, Phenotypic genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications, *Cancer Surveys*, 4:399-416, 1985.
- 40 **Donati**, Cancer and Thrombosis: from Phlegmasia *alba dolens* to transgenic mice, *Thromb. Haemost.*, 74:278-281, 1995.
- Drouvalakis y 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.
- 45 **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, *Thromb. Haemost.*, 66 (1) :67-79, 1991.
- 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.
- 5 **Flynn, Byrne, Baglin, Weissberg, Bennett**, Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells, *Blood*, 89 (12) :4378-4384, 1997.
- Folkman y otros**, Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone, *Science*, 221:719-725, 1983.
- 10 **Fotsis y otros**, The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth, *Nature*, 368 (6468) :237-239, 1994.
- Frater-Schroder y otros**, 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.
- 15 **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 y Collins**, Inhibition of angiogenesis by antiestrogens, *Cancer Res.*, 53 (3) :533-535, 1993.
- Gagliardi, Hadd, Collins**, Inhibition of angiogenesis by suramin, *Cancer Res.*, 52 (18) :5073-5075, 1992.
- 20 **Gagliardi y otros**, 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.
- 25 **Galli, Barbui, Zwaal, Comfurius, Bevers**, Antiphospholipid antibodies: involvement of protein cofactors, *Haematologica*, 78 (1) :1-4, 1993.
- Ge y Butcher**, Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell TGF-beta ligand, *Gene*, 138:201-206, 1994.
- Gefter y otros**, A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells, *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.
- 30 **Gibbons**, Man-Whitney-Wilcoxon test for two independent samples, *In: Nonparametric methods for quantitative analysis*, J.D.Gibbons (ed.) , Holt, Rinehart and Winston, New York, pp. 160, 1976.
- Glennie, y otros**, Preparation and performance of bispecific F (ab'gamma) 2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments, *J. Immunol.*, 139:2367-2375, 1987.
- 35 **Goding**, *In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2nd Edition*, Academic Press, Orlando, Fl., pp. 60-61, 65-66, 71-74, 1986.
- Good y otros**, 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.
- Grant y otros**, Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration, *Diabetes*, 47 (8) :1335-1340, 1998.
- 40 **Hagemeyer y otros**, A Monoclonal Antibody Reacting with Endothelial Cells of Budding Vessels in Tumors and Inflammator y Tissues, and Non-Reactive with Normal Adult Tissues, *Int. J. Cancer*, 38:481-488, 1986.
- Hahne, Jager, Isenmann, Hallmann, Vestweber**, Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes, *J. Cell Biol.*, 121:655-664, 1993.
- 45 **Hampton, Vanags, Porn-Ares, Orrenius**, Involvement of extracellular calcium in phosphatidylserine exposure during apoptosis, *FEBS Lett.*, 399 (3) :277-282, 1996.

- Haran** y otros, Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth, *Cancer Res.*, 54 (21) :5511-5514, 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.
- 5 **Hellerqvist** y otros, Antitumor effects of GBS toxin: a polysaccharide exotoxin from group B beta-hemolytic streptococcus, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 120 (1-2) :63-70, 1993.
- Hiscox** y **Jiang**, Interleukin-12, an emerging anti-tumour cytokine, *In Vivo*, 11 (2) :125-132, 1997.
- Holash** y otros, Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF, *Science*, 284:1994-1998, 1999.
- 10 **Hori** y otros, Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants, *Br. J. Pharmacol.*, 118 (7) :1584-1591, 1996.
- 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**, **Sastr** y **Iverson**, **Kang**, **Alting-Mees**, **Burton**, **Benkovic**, **Lerner**, *Science*, 246 (4935) :1275-1281, 1989.
- 15 **Igarashi**, **Umeda**, **Tokita**, **Soo Nam**, **Inoue**, Effective induction of anti-phospholipid and anticoagulant antibodies in normal mouse, *Thrombosis Res.*, 61:135-148, 1991.
- Ingber** y otros, Angioinhibins: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth, *Nature*, 48:555-557, 1990.
- 20 **Iwamoto** y otros, Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) ,*Br. J. Cancer*, 73 (5) :589-595, 1996.
- Jackson** y otros, Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein, *Science*, 266 (5190) :1581-1584, 1994.
- 25 **Jamasbi**, **Wan**, **Stoner**, Epitope masking of rat esophageal carcinoma tumor-associated antigen by certain coexisting glycolipid and phospholipid molecules: a potential mechanism for tumor cell escape from the host immune responses, *Cancer Immunol. Immunother.*, 38 (2) :99-106, 1994.
- Jendraschak** and **Sage**, Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology, *Semin. Cancer Biol.*, 7 (3) :139-146, 1996.
- 30 **Jones**, **Dear**, **Foote**, **Neuberger**, **Winter**, Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, *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. Cell. Res.*, 208 (2) :387-389, 1993.
- 35 **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**, **Tournier**, 12-O- Tetradecanoylphorbol-13-Acetate inhibits aminophospholipid translocase activity and modifies the lateral motions of fluorescent phospholipid analogs in the plasma membrane of bovine aortic endothelial cells, *Experimental Cell Res.*, 234:125-131, 1997.
- 40 **Kang**, **Barbas**, **Janda**, **Benkovic**, **Lerner**, Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces, *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.
- 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.
- 45 **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.
- Kleinman** y otros, 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.
- 5 **Konieczny, Bobrzecka, Laidler, Rybarska**, The combination of IgM subunits and proteolytic IgG fragment by controlled formation of interchain disulphides, *Haematologia*, 14 (1) :95-99, 1981.
- 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.
- 10 **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 y otros**, Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression, *Endocrinology*, 139 (9) :3696-3703, 1998.
- 15 **Leppink, Bishop, Sedmak, Henr y , 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.
- 20 **Lin, Shroyer, Walter, Ly den, Ng, Rote**, Monoclonal IgM antiphosphatidylserine antibody reacts against cytoskeleton-like structures in cultured human umbilical cord endothelial cells, *Am. J. Reprod. Immun.*, 33:97-107, 1995.
- Lin, Buxton, Acheson, Radziejewski, Maisonpierre, Yancopoulos, Channon, Hale, Dewhirst, George, Peters**, Anti-angiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95 (15) :8829-34, 1998.
- 25 **Lindner y Borden**, Effects of tamoxifen and interferon-beta or the combination on tumor-induced angiogenesis, *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.
- 30 **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.*, 57:3629-3634, 1997.
- Majewski y otros**, Vitamin D3 is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 1 (1) :97-101, 1996.
- 35 **Mandriota y Pepper**, Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia, *Circ. Res.*, 83 (8) :852-9, 1998.
- 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.
- 40 **Manetti y otros**, Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor, *Bioorg. Med. Chem.*, 6 (7) :947-958, 1998.
- Martin, Reutelingsperger, McGahon, Rader, van Schie, LaFace, Green**, Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl, *J. Exp. Med.*, 182 (5) :1545-1556, 1995.
- 45 **Matsuura, Igarashi, Yasuda, Triplett, Koike**, Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface, *J. Exp. Med.*, 179 (2) :457-462, 1994.
- McNeil, Simpson, Chesterman, Krilis**, Anti-phospholipid 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.

- Mills, Brooker, Camerini-Otero**, Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription, *Nucl. Acids Res.*, 18:7305-7316, 1990.
- Miyake, Medina, Ishihara, Kimoto, Auerbach, Kincade**, VCAM-like adhesion molecule on murine bone marrow stromal cells mediates binding of lymphocyte precursors in culture, *J. Cell. Biol.*, 114:557-565, 1991.
- 5 **Moldovan, Moldovan, Simionescu**, Binding of vascular anticoagulant alpha (annexin V) to the aortic intima of the hypercholesterolemic rabbit. An autoradiographic study, *Blood Coagul Fibrinolysis*, 5 (6) :921-928, 1994.
- Montesano, Pepper, Mohle-Steinlein, Risau, Wagner, Orci**, Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene, *Cell*, 62:435-445, 1990.
- Moore y otros**, Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines, *J. Lab. Clin. Med.*, 132 (2) :97-103, 1998.
- 10 **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, Oi**, Production of novel immunoglobulin molecules by gene transfection, *Mt. Sinai J. Med.*, 53 (3) :175, 1986.
- 15 **Morrissey, Fair, Edgington**, Monoclonal antibody analysis of purified and cell-associated tissue factor, *Thromb. Res.*, 52:247-261, 1988.
- Müller, Pomorski, Müller, Zachowski, Herrmann**, Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells, *Biochemistr y* , 33:9968-9974, 1994.
- 20 **Munro**, Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases, *European, Heart Journal*, 14:72-77, 1993.
- Murphy, Joseph, Stephens, Horrocks**, Phospholipid composition of cultured human endothelial cells, *Lipids*, 27 (s) :150-153, 1992.
- Murray, Clauss, Thurston, Stern**, Tumour-derived factors which induce endothelial tissue factor and enhance the procoagulant response to TNF, *Int. J. Radiat. Biol.*, 60 (1-2) :273-277, 1991.
- 25 **Nagler, Feferman, Shoshan**, Reduction in basic fibroblast growth factor mediated angiogenesis *in vivo* by linomide, *Connect Tissue Res.*, 37 (1-2) :61-68, 1998.
- Nakamura, Shidara, Kawaguchi, Azuma, Mitsuda, Onishi, Yamaji, Wada**, Lupus anticoagulant autoantibody induces apoptosis in umbilical vein endothelial cells: involvement of annexin V, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 205 (2) :1488-1493, 1994.
- 30 **Nakamura, Ban, Yamaji, Yoneda, Wada**, Localization of the apoptosis-inducing activity of lupus anticoagulant in an annexin V-binding antibody subset, *J. Clin. Invest.*, 101 (9) :1951-1959, 1998.
- Nawroth y Stern**, Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor, *J. Exp. Med.*, 163:740-745, 1986.
- 35 **Nawroth, Stern, Kisiel, Bach**, Cellular requirements for tissue factor generation by bovine aortic endothelial cells in culture, *Thromb. Res.*, 40:677-691, 1985.
- Nawroth, Handley, Matsueda, DeWaal, Gerlach, Blohm, Stern**, Tumor necrosis factor/cachectin-induced intravascular fibrin formation in meth A fibrosarcomas, *J. Exp. Med.*, 168:637-647, 1988.
- Obringer, Rote, Walter**, Antiphospholipid antibody binding to bilayer-coated glass microspheres, *J. Immun. Methods*, 185:81-93, 1995.
- 40 **Ogawa, Shreeniwas, Brett, Clauss, Furie, Stern**, The effect of hypoxia on capillary endothelial cell function: modulation of barrier and coagulant function, *J. Haematology*, 75:517-524, 1990.
- 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.
- 45 **Oikawa y otros**, A highly potent antiangiogenic activity of retinoids, *Cancer Lett.*, 48 (2) :157-162, 1989.
- O'Reilly y otros**, Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma, *Cell*, 79:315-328, 1994.

- O'Reilly** y otros, Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, *Cell*, 88 (2) :277-285, 1997.
- Ortel, Devore-Carter, Quinn-Allen, Kane**, Deletion analysis of recombinant human factor V. Evidence for a phosphatidylserine binding site in the second C-type domain, *J. Biol. Chem.*, 267:4189-4198, 1992.
- 5 **Papapetropoulos, Garcia-Cardena, Dengler, Maisonpierre, Yancopoulos, Sessa**, Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors, *Lab. Invest.*, 79 (2) :213-23, 1999.
- Parmley y Smith**, Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes, *Gene*, 73 (2) :305-318, 1988.
- 10 **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** y otros, Leukemia inhibitor y factor (LIF) inhibits angiogenesis *in vitro*, *J. Cell Sci.*, 108 (Pt 1) :73-83, 1995.
- Qamar, Gharavi, Levy, Lockshin**, Lysophosphatidylethanolamine is the antigen to which apparent antibody to phosphatidylethanolamine binds, *J. Clin. Immunol.*, 10 (4) :200-203, 1990.
- 15 **Qu, Conroy, Walker, Wooding, Lucy**, Phosphatidylserine-mediated adhesion of T-cells to endothelial cells, *J. Biochem.*, 317 (Pt 2) :343-346, 1996.
- Quinn** y otros, CM101, a polysaccharide antitumor agent, does not inhibit wound healing in murine models, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 121 (4) :253-256, 1995.
- Rao, Tait, Hoang**, Binding of annexin V to a human ovarian carcinoma cell line (OC-2008) . Contrasting effects on cell surface factor VIIa/tissue factor activity and prothrombinase activity, *Thromb. Res.*, 67 (5) :517-531, 1992.
- 20 **Rauch y 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.
- 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.
- 25 **Ravanat, Archipoff, Beretz, Freund, Cazenave, Freyssinet**, Use of annexin-V to demonstrate the role of phosphatidylserine exposure in the maintenance of hemostatic balance by endothelial cells, *Biochem. J.*, 282:7-13, 1992.
- RayChaudhury y D'Amore**, Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta, *J. Cell Biochem.*, 47 (3) :224-229, 1991.
- 30 **Richer y Lo**, Introduction of human DNA 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.
- Rote**, Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss, *Am. J. Reprod. Immun.*, 35:394-401, 1996.
- 35 **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, Ly den, Mori**, Expression of phosphatidylserine-dependent antigens on the surface of differentiating BeWo human choriocarcinoma cells, *Am. J. Reprod. Immun.*, 33:114-121, 1995.
- 40 **Ruf y Edgington**, Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis *in vivo*, *FASEB J.*, 8:385-390, 1994.
- Ruf, Rehemtulla, Edgington**, Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function, *Biol. Chem.*, 266:2158-2166, 1991.
- Sakamoto** y otros, Heparin plus cortisone acetate inhibit tumor growth by blocking endothelial cell proliferation, *Canc. J.*, 1:55-58, 1986.
- 45 **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, *Cell Res.*, 8 (3) :171-177, 1998.

- Schick**, The organization of aminophospholipids in human platelet membranes: selective changes induced by thrombin, *J. Lab. Clin. Med.*, 91 (5) :802-810, 1978.
- Schick, Kurica, Chacko**, Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane, *J. Clin. Invest.*, 57:1221-1226, 1976.
- 5 **Schoentgen, Saccoccio, Jolles, Bernier, Jolles**, Complete amino acid sequence of a basic 21-kDa protein from bovine brain cytosol, *Eur. J. Biochem.*, 166 (2) :333-338, 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.
- 10 **Schuurmans Stekhoven, Tijmes, Umeda, Inoue, De Pont**, Monoclonal antibody to phosphatidylserine inhibits Na⁺/K⁺-ATPase activity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1194:155-165, 1994.
- Sheibani y Frazier**, Thombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (15) :6788-6792, 1995.
- 15 **Sheu y otros**, Inhibition of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha (v) beta3 integrin monoclonal antibody, *Biochim. Biophys. Acta*, 1336 (3) :445-454, 1997.
- Shyu, Manor, Magner, Yancopoulos, Isner**, Direct intramuscular injection of plasmid DNA encoding angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 augments revascularization in the rabbit ischemic hindlimb, *Circulation*, 98 (19) :2081-7, 1998.
- 20 **Sideras, Mizuta, Kanamori, Suzuki, Okamoto, Kuze, Ohno, Doi, Fukuhara, Hassan, y otros**, Production of sterile transcripts of C gamma genes in an IgM-producing human neoplastic B cell line that switches to IgG-producing cells, *Intl. Immunol.*, 1 (6) :631-642, 1989.
- Sipos y otros**, Inhibition of tumor angiogenesis, *Ann. NY Acad. Sci.*, 732:263-272, 1994.
- 25 **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.
- 30 **Soff y otros**, 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.
- 35 **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.
- Stone, Ruf, 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.
- 40 **Stout, Basse, Luhm, Weiss, Wiedmer, Sims**, Scott syndrome erythrocytes contain a membrane protein capable of mediating Ca²⁺-dependent transbilayer migration of membrane phospholipids, *J. Clin. Invest.*, 99 (9) :2232-2238, 1997.
- Stratmann, Risau, Plate**, Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis, *Am. J. Pathol.*, 153 (5) :1333-9, 1998.
- 45 **Sugi y McIntyre**, Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex, *Blood*, 86 (8) :3083-3089, 1995.
- Sugi y McIntyre**, Phosphatidylethanolamine induces specific conformational changes in the kininogens recognizable by antiphosphatidylethanolamine antibodies, *Thromb. Haemost.*, 76 (3) :354-360, 1996a.
- Sugi y 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.
- 5 **Tada** y otros, 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.
- Takano** y otros, Suramin, an anticancer and angiostatic 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.
- 10 **Tanaka** y otros, Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth, *Nat. Med.* 3 (4) :437-442, 1997.
- Tanaka, Mori, Sakamoto, Makuuchi, Sugimachi, Wands**, Biologic significance of angiopoietin -2 expression in human hepatocellular carcinoma, *J. Clin. Invest.*, 103 (3) :341-5, 1999.
- Thornhill, Kyan-Aung, Haskard**, IL-4 increases human endothelial cell adhesiveness for T cells but not for neutrophils, *J. Immunol.*, 144:3060-3065, 1990.
- 15 **Thorpe** y otros, Heparin-Steroid Conjugates: New Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice, *Cancer Res.*, 53:3000-3007, 1993.
- Tolsma** y otros, Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity, *J. Cell Biol.*, 122 (2) :497-511, 1993.
- 20 **Toti, Satta, Fressinaud, Meyer, Freyssinet**, Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder, *Blood*, 87 (4) :1409-1415, 1996.
- Trudell, Ardies, Anderson**, Antibodies raised against trifluoroacetyl-protein adducts bind to N-trifluoroacetyl-phosphatidylethanolamine in hexagonal phase phospholipid micelles, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257 (2) :657-662, 1991a.
- 25 **Trudell JR, Ardies, Green, Allen**, Binding of anti-acetaldehyde IgG antibodies to hepatocytes with an acetaldehyde-phosphatidylethanolamine adduct on their surface, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 15 (2) :295-299, 1991b.
- Tr y ggvason**, The laminin family, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5 (5) :877-882, 1993.
- Umeda, Igarashi, Nam, Inoue**, Effective production of monoclonal antibodies against phosphatidylserine: Stereospecific recognition of phosphatidylserine by monoclonal antibody, *J. Immunol.*, 143 (7) :2273-2279, 1989.
- 30 **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, McClain, Copeland, Gilbert, Jenkins, Huang, Papadopoulos, Maisonpierre, Davis, Yancopoulos**, Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96 (5) :1904-9, 1999.
- 35 **Van Dijk, Warnaar, van Eendenburg, Thienpont, Braakman, Boot, Fleuren, Bolhuis**, Induction of tumor-cell lysis by bi-specific monoclonal antibodies recognizing renal-cell and CD3 antigen, *Int. J. Cancer*, 43:344-349, 1989.
- Van Heerde, Poort, van T Veer, Reutelingsperger, de Groot**, Binding of recombinant annexin V to endothelial cells: effect of annexin V binding on endothelial-cells-mediated thrombin formation, *J. Biochem*, 302:305-312, 1994.
- 40 **Vermes, Haanes, Steffens-Nakken, Reutelingsperger**, A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V, *J. Immunol. Methods*, 184 (1) :39-51, 1995.
- Vitetta** y otros, Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma, *Cancer Res.*, 15:4052-4058, 1991.
- 45 **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 via thrombospondin-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (11) :6343-6348, 1998.
- Vukanovic** y otros, Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide, *Cancer Res.*, (8) :1833-1837, 1993.
- 5 **Waltenberger** y otros, Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action, *J. Mol. Cell Cardiol.*, (7) :1523-1529, 1996.
- Wamil** y otros, Soluble E-selectin in cancer patients as a marker of the therapeutic efficacy of CM101, a tumor-inhibiting anti-neovascularization agent, evaluated in phase I clinical trial, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 123 (3) :173-179, 1997.
- 10 **Wells**, Starving cancer into submission, *Chem. Biol.*, (4) :R87-88, 1998.
- 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.
- White, Handler, Smith, Hill, Lehman**, In: *Principles of Biochemistry*, 6th Edition, McGraw-Hill, Inc. N.Y., Chapter 3, pp. 48-54, 1978.
- 15 **Williamson y Schlegel**, Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells, *Molec. Mem. Biol.*, 11:199-216, 1994.
- Winter y Milstein**, Man-made antibodies, *Nature*, 349:293-299, 1991.
- Wolff** y otros, Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary-like structures *in vitro* and angiogenesis *in vivo*, *Klin. Padiatr.*, 209 (4) :275-277, 1997.
- 20 **Yamada, Moldow, Sacks, Craddock, Boogaens y Jacob**, Deleterious Effects of Endotoxin on Cultured Endothelial Cells: An *in vitro* Model of Vascular injury, *Inflammation*, 5:115-116, 1981.
- Yamamura** y otros, Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis, *Semin. Cancer Biol.*, (4) :259-265, 1993.
- 25 **Yoon** y otros, Inhibitor and effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice, *Cancer Lett.* 97 (1) :83-91, 1995.
- Yoshida** y otros, Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by fumagillin derivative TNP470: possible involvement of nitric oxide synthase, *Cancer Res.*, (16) :3751-3756, 1998.
- Zacharski, Memoli, Ornstein, Rousseau, Kisiel, Kudryk**, Tumor cell procoagulant and urokinase expression in carcinoma of the ovary, *J. Natl. Cancer Inst.*, 85:1225-1230, 1993.
- 30 **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.
- 35 **Ziche y otros**, Linomide blocks angiogenesis by breast carcinoma vascular endothelial growth factor transfectants, *Br. J. Cancer*, (7) :1123-1129, 1998.
- 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.
- 40 **Zwaal, Comfurius, Bevers**, Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1180:1-8, 1992.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> THORPE, PHILIP E.
 RAN, SOPHIA
 5

<120> TRATAMIENTO DE CÁNCER CON UTILIZACIÓN DE CONJUGADOS TERAPÉUTICOS QUE SE UNEN
 A AMINOFOSFOLÍPIDOS

10 <130> 4001.002310

<140> DESCONOCIDOS

15 <141> 1999-07-12

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

20 <210> 1

<211> 2149

<212> DNA

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

30 cagctgactc aggcaggetc catgctgaac ggtcacacag agaggaaaca ataaatctca 60
 gctactatgc aataaatatc tcaagtttta acgaagaaaa acatcattgc agtgaataa 120
 aaaattttta aatttttaga caaagctaac aaatggctag ttttctatga ttcttctca 180
 aacgctttct ttgaggggga aagagtcaaa caaacaagca gttttacctg aaataaagaa 240
 ctagtttttag aggtcagaag aaaggagcaa gttttgcgag aggcacggaa ggagtgtgct 300
 35 ggcagtacaa tgacagtttt cctttccttt gctttcctcg ctgccattct gactcacata 360
 ggggtgcagca atcagcgccg aagtccagaa aacagtggga gaagatataa cgggattcaa 420
 catgggcaat gtgcctacac ttctattctt ccagaacacg atggcaactg tctgtgagagt 480
 acgacagacc agtacaacac aaacgctctg cagagagatg ctccacacgt ggaaccggat 540
 40 ttctcttccc agaaacttca acatctggaa catgtgatgg aaaattatac tcagtggctg 600
 taaaaacttg agaattacat tgtggaaaac atgaagtgg agatggccca gatacagcag 660
 aatgacagtc agaccagaaa gctgacagat gttgagaccc aggtactaaa tcaaaactct 720
 actgcagagc agaccagaaa gctgacagat gttgagaccc aggtactaaa tcaaaactct 780
 cgacttgaga tacagctgct ggagaattca ttatccacct acaagctaga gaagcaactt 840
 45 cttcaacaga caaatgaaat cttgaagatc catgaaaaaa acagtttatt agaacataaa 900
 atcttagaaa tggaaagaaa acacaaggaa gagttggaca ccttaaagga agagaagag 960
 aaccttcaag gcttggttac togtcaaaaca tatataatcc agggagctgga aaagcaatta 1020
 aacagagcta ccaccaacaa cagtgtcctt cagaagcagc aactggagct gatggacaca 1080
 50 gtccacaacc ttgtcaatct ttgcactaaa gaaggtggtt tactaaaggg aggaaaaaga 1140
 gaggaagaga aaccatttag agactgtgca gatgtatate aagctgggtt taataaaagt 1200
 ggaatctaca ctatttatat taataatag ccagaaccca aaaaggtggt ttgcaatatg 1260
 gatgtcaatg ggggaggttg gactgtaata caacatcgtg aagatggag tctagatttc 1320
 55 caaagaggct ggaaggaata taaaatgggt tttggaaatc cctccggtga atattggctg 1380
 gggaaatgagt ttatttttgc cattaccagt cagaggcagt acatgctaag aattgagtta 1440
 atggactggg aagggaaacc agcctattca cagtatgaca gattccacat aggaaatgaa 1500
 tagcaaaaact ataggttgta tttaaaaggt cacactggga cagcaggaaa acagagcagc 1560
 60 ttgatcttac acggtgctga ttccagcact aaagatgctg ataatgacaa ctgtatgtgc 1620
 aaatgtgcc tcatgttaac agggaggatgg tggtttgatg cttgtggccc ctccaactca 1680
 aatggaatgt tctatactgc gggacaaaac catggaaaac tgaatgggat aaagtggcac 1740
 tacttcaaag ggeccagtta ctcttaactg tccacaacta tgatgatctg acctttagat 1800
 65 ttttgaaaagc gcaatgtcag aagcgattat gaaagcaaca aagaaatccg gagaagctgc 1860

ES 2 533 255 T3

5 caggtgagaa actgtttgaa aacttcagaa gcaaacaata ttgtctccct tccagcaata 1920
 agtgtagtt atgtgaagtc accaagggtc ttgaccgtga atctggagcc gtttgagttc 1980
 acaagagtct ctacttgggg tgacagtget cacgtggctc gactatagaa aactccactg 2040
 actgtcgggc tttaaaaagg gaagaaactg ctgagcttgc tgtgcttcaa actactactg 2100
 gaccttattt tggaactatg gtagccagat gataaatatg gttaatttc 2149

<210> 2

10 <211> 498

<212> PTR

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 2

	Met	Thr	Val	Phe	Leu	Ser	Phe	Ala	Phe	Leu	Ala	Ala	Ile	Leu	Thr	His
	1				5					10					15	
20	Ile	Gly	Cys	Ser	Asn	Gln	Arg	Arg	Ser	Pro	Glu	Asn	Ser	Gly	Arg	Arg
				20					25					30		
25	Tyr	Asn	Arg	Ile	Gln	His	Gly	Gln	Cys	Ala	Tyr	Thr	Phe	Ile	Leu	Pro
			35					40					45			
	Glu	His	Asp	Gly	Asn	Cys	Arg	Glu	Ser	Thr	Thr	Asp	Gln	Tyr	Asn	Thr
		50					55					60				
30	Asn	Ala	Leu	Gln	Arg	Asp	Ala	Pro	His	Val	Glu	Pro	Asp	Phe	Ser	Ser
	65					70					75					80
35	Gln	Lys	Leu	Gln	His	Leu	Glu	His	Val	Met	Glu	Asn	Tyr	Thr	Gln	Trp
					85					90					95	
	Leu	Gln	Lys	Leu	Glu	Asn	Tyr	Ile	Val	Glu	Asn	Met	Lys	Ser	Glu	Met
				100					105					110		
40	Ala	Gln	Ile	Gln	Gln	Asn	Ala	Val	Gln	Asn	His	Thr	Ala	Thr	Met	Leu
			115					120					125			
45	Glu	Ile	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu	Ser	Gln	Thr	Ala	Glu	Gln	Thr	Arg	Lys
		130					135					140				
	Leu	Thr	Asp	Val	Glu	Thr	Gln	Val	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Leu	Glu
	145					150					155					160
50	Ile	Gln	Leu	Leu	Glu	Asn	Ser	Leu	Ser	Thr	Tyr	Lys	Leu	Glu	Lys	Gln
					165					170					175	
55	Leu	Leu	Gln	Gln	Thr	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys	Ile	His	Glu	Lys	Asn	Ser
				180					185					190		
	Leu	Leu	Glu	His	Lys	Ile	Leu	Glu	Met	Glu	Gly	Lys	His	Lys	Glu	Glu
			195					200					205			
60	Leu	Asp	Thr	Leu	Lys	Glu	Glu	Lys	Glu	Asn	Leu	Gln	Gly	Leu	Val	Thr
		210					215					220				

65

ES 2 533 255 T3

5 Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala
 225 230 235 240
 Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp
 245 250 255
 10 Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu
 260 265 270
 15 Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp
 275 280 285
 Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile
 290 295 300
 20 Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn
 305 310 315 320
 25 Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp
 325 330 335
 Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser
 340 345 350
 30 Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln
 355 360 365
 35 Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg
 370 375 380
 40 Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn
 385 390 395 400
 Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser
 405 410 415
 45 Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn
 420 425 430
 50 Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp
 435 440 445
 Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala
 450 455 460
 55 Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys
 465 470 475 480
 60 Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu
 485 490 495
 Asp Phe

65

<210> 3
 <211> 2269
 <212> DNA
 5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

```

10      tggggtggtg tttatctcct cccagccttg agggagggaa caacactgta ggatctgggg 60
      agagaggaac aaaggaccgt gaaagctgct ctgtaaaagc tgacacagcc ctccaagtg 120
      agcaggactg ttcttccac tgcaatctga cagtttactg catgcctgga gagaacacag 180
      cagtaaaaac caggtttgct actggaaaaa gaggaagag aagacttca ttgacggacc 240
      cagccatggc agcgtagcag ccctgcgttt cagacggcag cagctcggga ctctggacgt 300
15      gtgtttgcc tcaagtttgc taagctgctg gtttattact gaagaaagaa tgtggcagat 360
      tgttttcttt actctgagct gtgatcttgt cttggccgca gcctataaca actttcggaa 420
      gagcatggac agcataggaa agaagcaata tcaggtccag catgggtcct gcagctacac 480
      tttctctctg ccagagatgg acaactgccg ctcttctctc agcccctacg tgtccaatgc 540
20      tgtgcagagg gacgcgccgc tcgaatacga tgactcggtg cagaggctgc aagtgcctgg 600
      gaacatcatg gaaaacaaca ctcagtggtc aatgaagctt gagaattata tccaggacaa 660
      catgaagaaa gaaatggtag agatacagca gaatgcagta cagaaccaga cggctgtgat 720
      gatagaaata gggacaaaac tgttgaacca aacagctgag caaacgcgga agttaactga 780
      tgtggaagcc caagtattaa atcagaccac gagacttgaa cttcagctct tggaaactc 840
25      cctctcgaca aacaaattgg aaaaacagat tttggaccag accagtgaaa taacaaatt 900
      gcaagataag aacagtttcc tagaaaagaa ggtgctagct atggaagaca agcacatcat 960
      ccaactacag tcaataaaag aagagaaaga tcagctacag gtgttagtat ccaagcaaaa 1020
      ttccatcatt gaagaactag aaaaaaaaaat agtgactgcc acggtgaata attcagttct 1080
30      tcaaaagcag caacatgate tcactggagac agttaataac ttactgacta tgatgtccac 1140
      atcaaaactca gctaaggacc ccactgttgc taagaagaa caaatcagct tcagagactg 1200
      tgctgaagta ttcaaatcag gacacaccac aaatggcatc tacacgttaa cattccctaa 1260
      ttctacagaa gagatcaagg cctactgtga catggaagct ggaggaggcg ggtggacaat 1320
35      tattcagcga cgtgaggatg gcagcgttga ttttcagagg acttggaaag aatataaagt 1380
      gggatttggc aacccttcag gagaatattg gctgggaaat gagtttgttt cgcaactgac 1440
      taatcagcaa cgctatgtgc ttaaaataca cettaaagac tgggaagga atgaggctta 1500
      ctcatgtat gaacatttct atctctcaag tgaagaactc aattatagga ttcaccttaa 1560
      aggacttaca gggacagccg gcaaaataag cagcatcagc caaccaggaa atgattttag 1620
40      cacaaaggat ggagacaacg acaaatgtat ttgcaaatgt tcacaaatgc taacaggagg 1680
      ctggtggttt gatgcatgtg gtccttccaa cttgaaegga atgtactatc cacagaggca 1740
      gaacacaaat aagttcaacg gcattaaatg gtactactgg aaaggctcag gctattcgct 1800
      caaggccaca accatgatga tcogaccagc agatttctaa acateccagt ccacctgagg 1860
45      aactgtctcg aactattttc aaagacttaa gccagtgca ctgaaagtca cggctgcgca 1920
      ctgtgtcctc ttccaccaca gagggcgtgt gctcgggtgt gacgggacc acatgctcca 1980
      gattagagcc tgtaaacttt atcacttaaa cttgcatcac ttaacggacc aaagcaagac 2040
      cctaaacatc cataattgtg attagacaga acacctatgc aaagatgaac ccgaggctga 2100
50      gaatcagact gacagtttac agacgctgct gtcacaacca agaattgtat gtgcaagttt 2160
      atcagtaaat aactggaaaa cagaacactt atgttataca atacagatca tcttggaaact 2220
      gcattcttct gagcactgtt tatacactgt gtaataatcc atatgtcct 2269
    
```

<210> 4
 55 <211> 496
 <212> PTR
 <213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 533 255 T3

<400> 4

	Met	Trp	Gln	Ile	Val	Phe	Phe	Thr	Leu	Ser	Cys	Asp	Leu	Val	Leu	Ala
	1				5					10					15	
5	Ala	Ala	Tyr	Asn	Asn	Phe	Arg	Lys	Ser	Met	Asp	Ser	Ile	Gly	Lys	Lys
				20					25					30		
10	Gln	Tyr	Gln	Val	Gln	His	Gly	Ser	Cys	Ser	Tyr	Thr	Phe	Leu	Leu	Pro
			35					40					45			
15	Glu	Met	Asp	Asn	Cys	Arg	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	Tyr	Val	Ser	Asn	Ala
	50						55					60				
20	Val	Gln	Arg	Asp	Ala	Pro	Leu	Glu	Tyr	Asp	Asp	Ser	Val	Gln	Arg	Leu
	65					70					75					80
25	Gln	Val	Leu	Glu	Asn	Ile	Met	Glu	Asn	Asn	Thr	Gln	Trp	Leu	Met	Lys
					85					90					95	
30	Leu	Glu	Asn	Tyr	Ile	Gln	Asp	Asn	Met	Lys	Lys	Glu	Met	Val	Glu	Ile
			100						105					110		
35	Gln	Gln	Asn	Ala	Val	Gln	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Met	Ile	Glu	Ile	Gly
			115					120					125			
40	Thr	Asn	Leu	Leu	Asn	Gln	Thr	Ala	Glu	Gln	Thr	Arg	Lys	Leu	Thr	Asp
		130					135					140				
45	Val	Glu	Ala	Gln	Val	Leu	Asn	Gln	Thr	Thr	Arg	Leu	Glu	Leu	Gln	Leu
	145					150					155					160
50	Leu	Glu	His	Ser	Leu	Ser	Thr	Asn	Lys	Leu	Glu	Lys	Gln	Ile	Leu	Asp
				165						170					175	
55	Gln	Thr	Ser	Glu	Ile	Asn	Lys	Leu	Gln	Asp	Lys	Asn	Ser	Phe	Leu	Glu
				180					185					190		
60	Lys	Lys	Val	Leu	Ala	Met	Glu	Asp	Lys	His	Ile	Ile	Gln	Leu	Gln	Ser
			195					200					205			
65	Ile	Lys	Glu	Glu	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Val	Leu	Val	Ser	Lys	Gln	Asn
		210					215					220				
70	Ser	Ile	Ile	Glu	Glu	Leu	Glu	Lys	Lys	Ile	Val	Thr	Ala	Thr	Val	Asn
	225					230					235					240
75	Asn	Ser	Val	Leu	Gln	Lys	Gln	Gln	His	Asp	Leu	Met	Glu	Thr	Val	Asn
					245					250					255	
80	Asn	Leu	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Thr	Ser	Asn	Ser	Ala	Lys	Asp	Pro	Thr
				260						265				270		
85	Val	Ala	Lys	Glu	Glu	Gln	Ile	Ser	Phe	Arg	Asp	Cys	Ala	Glu	Val	Phe
			275					280					285			
90	Lys	Ser	Gly	His	Thr	Thr	Asn	Gly	Ile	Tyr	Thr	Leu	Thr	Phe	Pro	Asn
		290					295					300				

ES 2 533 255 T3

Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 5 Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln
 325 330 335
 10 Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu
 340 345 350
 15 Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg
 355 360 365
 Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr
 370 375 380
 20 Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg
 385 390 395 400
 25 Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile
 405 410 415
 Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys
 420 425 430
 30 Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp
 435 440 445
 35 Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln
 450 455 460
 40 Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser
 465 470 475 480
 Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe
 485 490 495

45 <210> 5
 <211> 495
 <212> PTR
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 5

55 Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys
 20 25 30
 60 Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro

65

ES 2 533 255 T3

					325					330					335				
5	Gly	Trp	Lys	Glu	Tyr	Lys	Met	Gly	Phe	Gly	Asn	Pro	Ser	Gly	Glu	Tyr			
				340					345					350					
10	Trp	Leu	Gly	Asn	Glu	Phe	Ile	Phe	Ala	Ile	Thr	Ser	Gln	Arg	Gln	Tyr			
			355					360					365						
15	Met	Leu	Arg	Ile	Glu	Leu	Met	Asp	Trp	Glu	Gly	Asn	Arg	Ala	Tyr	Ser			
			370				375					380							
20	Gln	Tyr	Asp	Arg	Phe	His	Ile	Gly	Asn	Glu	Lys	Gln	Asn	Tyr	Arg	Leu			
			385			390					395					400			
25	Tyr	Leu	Lys	Gly	His	Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Lys	Gln	Ser	Ser	Leu	Ile			
					405					410						415			
30	Leu	His	Gly	Ala	Asp	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ala	Asp	Asn	Asp	Asn	Cys			
				420					425					430					
35	Met	Cys	Lys	Cys	Ala	Leu	Met	Leu	Thr	Gly	Gly	Trp	Trp	Phe	Asp	Ala			
			435				440						445						
40	Cys	Gly	Pro	Ser	Asn	Leu	Asn	Gly	Met	Phe	Tyr	Thr	Ala	Gly	Gln	Asn			
			450				455					460							
45	His	Gly	Lys	Leu	Asn	Gly	Ile	Lys	Trp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Pro	Ser			
						470					475					480			
50	Tyr	Ser	Leu	Arg	Ser	Thr	Thr	Met	Met	Ile	Arg	Pro	Leu	Asp	Phe				
					485					490					495				

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una cantidad biológicamente efectiva de un anticuerpo anti-aminofosfolípido o de una región de unión al antígeno del mismo, para el tratamiento del cáncer para el tratamiento del cáncer por exterminio de células endoteliales vasculares de un tumor de un tumor vascularizado, que induce la coagulación en la vasculatura tumoral o que destruye la vasculatura tumoral.
2. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo anti-aminofosfolípido o región de unión al antígeno del mismo se une a un complejo amonifosfolípido proteína en la superficie luminal de los vasos sanguíneos de un tumor vascularizado.
- 10 3. La composición para uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha composición comprende un anticuerpo anti-aminofosfolípido IgG o IgM o una región de unión al antígeno del mismo.
4. La composición para uso según la reivindicación 1, 2 ó 3, en la que dicha composición comprende un anticuerpo anti-aminofosfolípido IgG.
5. La composición para uso según la reivindicación 1, 2 ó 3, en la que dicha composición comprende un fragmento de unión a antígeno scFv, Fv, Fab', Fab o F(ab')₂ de un anticuerpo anti-aminofosfolípido.
- 15 6. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende un anticuerpo anti-aminofosfolípido monoclonal, o una región de unión al antígeno del mismo.
- 20 7. La composición para uso según la reivindicación 6, en la que dicho anticuerpo anti-aminofosfolípido monoclonal, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se prepara mediante un proceso de preparación que comprende:
 - (a) preparar una célula que produce un anticuerpo anti- aminofosfolípido; y
 - (b) obtener un anticuerpo anti- aminofosfolípido monoclonal a partir de dicha célula que produce el anticuerpo.
- 25 8. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que dicha célula que produce un anticuerpo anti-aminofosfolípido es una célula de paciente humano, en donde dicho paciente tiene una enfermedad asociada con la producción de anticuerpos anti-aminofosfolípidos.
9. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que dicha célula que produce un anticuerpo anti-aminofosfolípido se obtiene mediante la estimulación in vitro de una población mezclada de linfocitos de sangre periférica humana con una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido.
- 30 10. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que dicha célula que produce un anticuerpo anti-aminofosfolípido se obtiene inmunizando un animal no humano con una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido.
11. La composición para uso según la reivindicación 10, en la que dicha célula que produce anticuerpo anti-aminofosfolípido se obtiene inmunizando un ratón transgénico que comprende una biblioteca de anticuerpos humanos con una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido.
- 35 12. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que dicho proceso preparativo comprende:
 - (a) fusionar dicha célula que produce un anticuerpo anti- aminofosfolípido con una célula inmortal para preparar un hibridoma que produzca un anticuerpo anti-aminofosfolípido monoclonal; y
 - (b) obtener dicho anticuerpo anti- aminofosfolípido monoclonal a partir de dicho hibridoma.
- 40 13. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que dicho proceso preparativo comprende:
 - (a) inmunizar un animal no humano con una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido;
 - (b) preparar una colección de hibridomas que producen anticuerpos a partir del animal inmunizado;
 - (c) seleccionar de la colección un hibridoma que produce un anticuerpo anti-aminofosfolípido; y
 - 45 (d) cultivar el hibridoma seleccionado para proporcionar dicho anticuerpo monoclonal anti-aminofosfolípido.

14. La composición para uso según la reivindicación 13, en la que el animal inmunizado es un ratón transgénico que comprende una biblioteca de anticuerpos humanos y en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-aminofosfolípido es un anticuerpo monoclonal humano.
15. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que dicho proceso preparativo comprende:
- 5 (a) obtener ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-aminofosfolípido a partir de dicha célula que produce anticuerpo anti-aminofosfolípido; y
- (b) expresar dichos ácidos nucleicos para obtener un anticuerpo anti-aminofosfolípido recombinante monoclonal.
16. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que dicho proceso preparativo comprende:
- 10 (a) inmunizar un animal no humano con una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido;
- (b) preparar una biblioteca de fagémidos de inmunoglobulina combinatoria que expresa ARN aislado del bazo del animal inmunizado;
- (c) seleccionar de la biblioteca de fagémidos un clon que expresa un anticuerpo anti-aminofosfolípido; y
- 15 (d) expresar los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-aminofosfolípido a partir de dicho clon seleccionado para proporcionar un anticuerpo monoclonal anti-aminofosfolípido recombinante.
17. La composición para uso según la reivindicación 16, en la que el animal inmunizado es un ratón transgénico que comprende una biblioteca de anticuerpos humanos y en la que el anticuerpo monoclonal anti-aminofosfolípido recombinante es un anticuerpo monoclonal recombinante humano.
- 20 18. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende un anticuerpo anti-aminofosfolípido quimérico humano, humanizado o parte humano, o una región de unión al antígeno del mismo.
19. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende un dímero, trímero o multímero de un anticuerpo anti-aminofosfolípido o fragmentos de
- 25 unión al antígeno del mismo.
20. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende un anticuerpo anti-aminofosfolípido o una región de unión al antígeno del mismo, que se une a fosfatidiletanolamina en la superficie luminal de vasos sanguíneos de un tumor vascularizado.
21. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende un anticuerpo anti-aminofosfolípido o una región de unión al antígeno del mismo que se une a fosfatidilserina en la superficie luminal de los vasos sanguíneos de un tumor vascularizado.
- 30 22. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende al menos dos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno del mismo, cada uno de los cuales se une a un aminofosfolípido distinto.
- 35 23. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende un anticuerpo anti-aminofosfolípido o una región de unión al antígeno del mismo, que se une a fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina o fosfatidaleanolamina.
24. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende un anticuerpo anti-aminofosfolípido o una región de unión al antígeno del mismo,
- 40 preparado mediante un proceso preparativo que comprende:
- (a) la estimulación in vitro de una población mezclada de linfocitos de sangre periférica humana con una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido;
- (b) inmunizar un animal no humano con una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido;
- 45 (c) inmunizar un ratón transgénico que comprende una biblioteca de anticuerpos humanos con una cantidad inmunogénicamente efectiva de una muestra de aminofosfolípido;
- (d) obtener y expresar un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-aminofosfolípido; o

- (e) seleccionar y expresar un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-aminofosfolípido a partir de una biblioteca de fagémidos de inmunoglobulinas combinatorias que expresa ARN aislado del bazo de un animal no humano inmunizado con una cantidad efectiva de una muestra de aminofosfolípido.
- 5 25. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende un anticuerpo anti-aminofosfolípido o una región de unión al antígeno que se une a complejos lípido-proteína en los que la parte lipídica del complejo es fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina y la parte proteica del complejo es uno cualquiera de β_2 -glicoproteína I, protrombina, quininógenos y precalicreína.
26. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es para uso en la inducción de la vasculatura tumoral después de administración a dicho animal.
- 10 27. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es para uso en la destrucción de la vasculatura tumoral después de administración a dicho animal.
28. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición está formulada para administración intravenosa.
- 15 29. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición está formulada como una formulación liposomal.
30. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición está destinada para administración humana.
31. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es para uso en combinación con una cantidad efectiva desde un punto de vista diagnóstico de un anticuerpo marcado de forma detectable o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a un aminofosfolípido.
- 20 32. La composición para uso según la reivindicación 31, en la que dicho anticuerpo marcado de forma detectable o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende el compuesto detectable por rayos X bismuto (III), oro (III), lantano (III) o plomo (II).
- 25 33. La composición para uso según la reivindicación 31, en la que dicho anticuerpo marcado de forma detectable o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende el ión radioactivo detectable cobre⁶⁷, galio⁶⁷, galio⁶⁸, indio¹¹¹, indio¹¹³, yodo¹²³, yodo¹²⁵, yodo¹³¹, mercurio¹⁹⁷, mercurio²⁰³, renio¹⁸⁶, renio¹⁸⁸, rubidio⁹⁷, rubidio¹⁰³, tecnecio^{99m} o itrio⁹⁰.
- 30 34. La composición para uso según la reivindicación 31, en la que dicho anticuerpo marcado de forma detectable o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende el isótopo detectable por resonancia de espín magnética nuclear cobalto (II), cobre (II), cromo (III), disprosio (III), erbio (III), gadolinio (III); holmio (III), hierro (II), hierro (III), manganeso (II); neodimio (III), níquel (II), samario (III), terbio (III), vanadio (II) o iterio (III).
- 35 35. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es para uso en combinación con una cantidad biológicamente efectiva de un segundo agente anticanceroso.
- 35 36. La composición para uso según la reivindicación 35, en la que dicha composición y dicho segundo agente anticanceroso están comprendidos dentro de una única composición farmacéutica.
37. La composición para uso según la reivindicación 35, en la que dicha composición y dicho segundo agente anticanceroso están comprendidos dentro de composiciones farmacéuticas distintas.
- 40 38. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en la que dicho segundo agente anticanceroso es un agente quimioterapéutico, radioterapéutico, anti-angiogénico o inductor de apoptosis.
- 45 39. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en la que dicho segundo agente anticanceroso es un constructo de agente terapéutico-anticuerpo que comprende un anticuerpo de direccionado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo se une a un componente expresado superficialmente, accesible superficialmente o localizado superficialmente de una célula tumoral, estroma tumoral o vasculatura tumoral; dicho anticuerpo de direccionado o fragmento del mismo enlazado operativamente a un agente terapéutico.
40. La composición para uso según la reivindicación 39, en la que dicho anticuerpo de direccionado o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a un antígeno superficial celular de una célula tumoral o a un componente de un estroma tumoral.
- 50 41. La composición para uso según la reivindicación 39, en la que dicho anticuerpo de direccionado o fragmento de unión al antígeno del mismo, se une a un componente expresado superficialmente, accesible superficialmente,

localizado superficialmente, inducible por citoquina o inducible por coagulante de vasos sanguíneos intratumorales de un tumor vascularizado.

- 5 42. La composición para uso según la reivindicación 41, en la que dicho anticuerpo de direccionado o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a un componente expresado superficialmente de vasculatura intratumoral seleccionado del grupo que consiste en un aminofosfolípido, endoglina, un receptor TGFβ, E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1, PSMA, un receptor VEGF/VPF, un receptor FGF, un TIE, $\alpha_v\beta_3$ integrina, pleyotropina, endosialina y una proteína MHC Clase II.
- 10 43. La composición para uso según la reivindicación 41, en la que dicho anticuerpo de direccionado o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a un componente localizado superficialmente de vasculatura intratumoral seleccionado del grupo que consiste en VEGF/VPF, FGF, TGFβ, un ligando que se une a un TIE, a una isoforma de fibronectina asociada a tumor, factor de crecimiento disperso/hepatocito (HGF), factor de plaquetas 4 (PF4), PDGF y TIMP.
- 15 44. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 39 a 43, en la que dicho anticuerpo de direccionado o fragmento de unión al antígeno del mismo, está enlazado operativamente a un agente citotóxico.
- 15 45. La composición para uso según la reivindicación 44, en la que dicho anticuerpo de direccionado o fragmento de unión al antígeno del mismo está enlazado operativamente a una toxina derivada de planta, hongo o bacteria, en la que opcionalmente y preferiblemente la toxina es cadena de ricina A desglucosilada.
- 20 46. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 39 a 43, en la que dicho anticuerpo de direccionado o fragmento de unión al antígeno del mismo está enlazado operativamente a un factor de coagulación o a un anticuerpo, o a un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a un factor de coagulación.
- 25 47. La composición para uso según la reivindicación 46, en la que dicho anticuerpo de direccionado o fragmento de unión al antígeno del mismo está enlazado operativamente al Factor de Tejido, Factor de Tejido truncado, o un derivado de los mismos o a un anticuerpo o a un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al Factor de tejido. Factor de Tejido truncado o a un derivado del mismo.
- 25 48. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en la que dicho segundo agente anticanceroso es un agente seleccionado del grupo que consiste en taxol, vincristina, vinblastina, bleomicina, una combretastatina, una podofilotoxina, TNF- α , angiostatina, endostatina, vasculostatina, un antagonista $\alpha_v\beta_3$, una citoquina, interleuquina-4, H₂O₂, trombina, un compuesto que interfiere con la actividad de la tubulina, un agente inductor del flujo de calcio y un ionóforo de calcio.
- 30 49. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en la que dicho segundo agente anticanceroso es un agente seleccionado del grupo que consiste en inhibidor de la fosfotirosina, un análogo de fosfotirosina no hidrolizable, un análogo de pirimidina, un análogo del ácido fólico, un complejo de coordinación de platino, un antiandrógeno y un análogo de la hormona de liberación de gonadotropina.
- 35 50. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en la que dicho segundo agente anticanceroso es un agente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, taxol, paclitaxel, 5-fluoracilo, camptotecina, cisplatino, carboplatino y leuprolida.

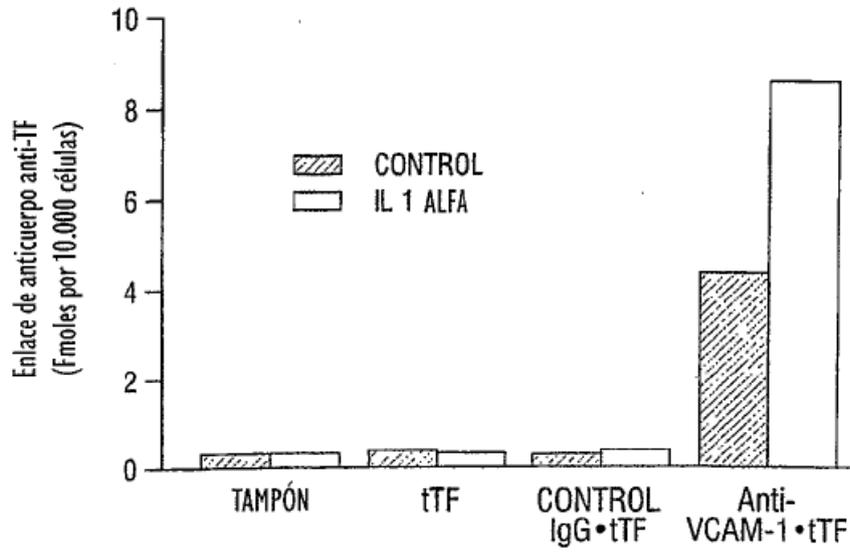


FIG. 1A

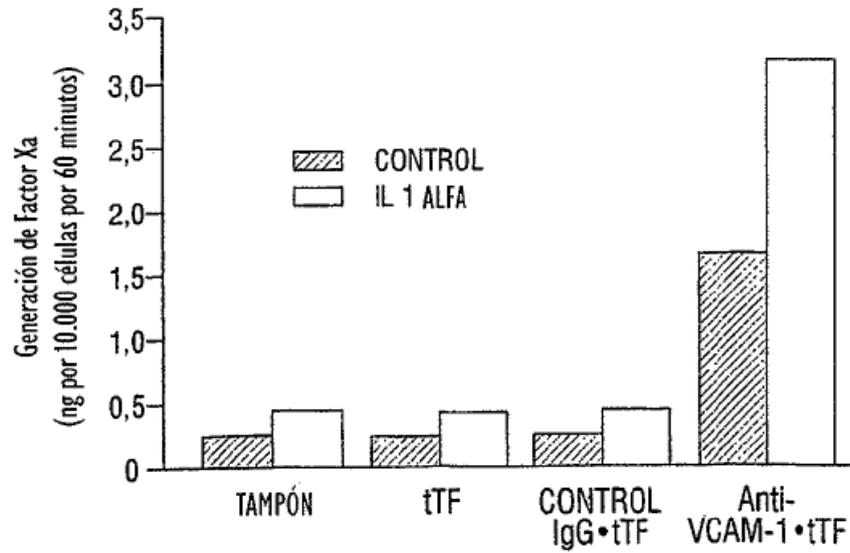


FIG. 1B

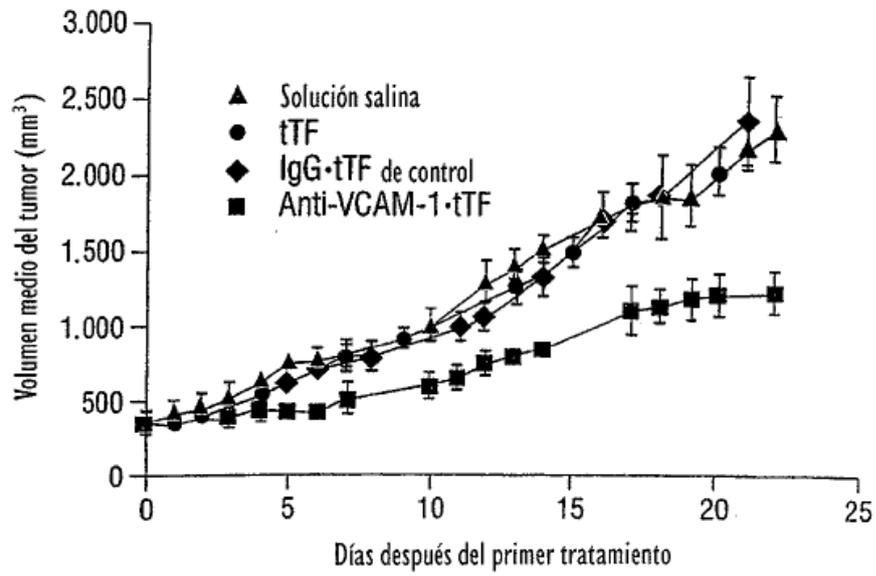


FIG. 2

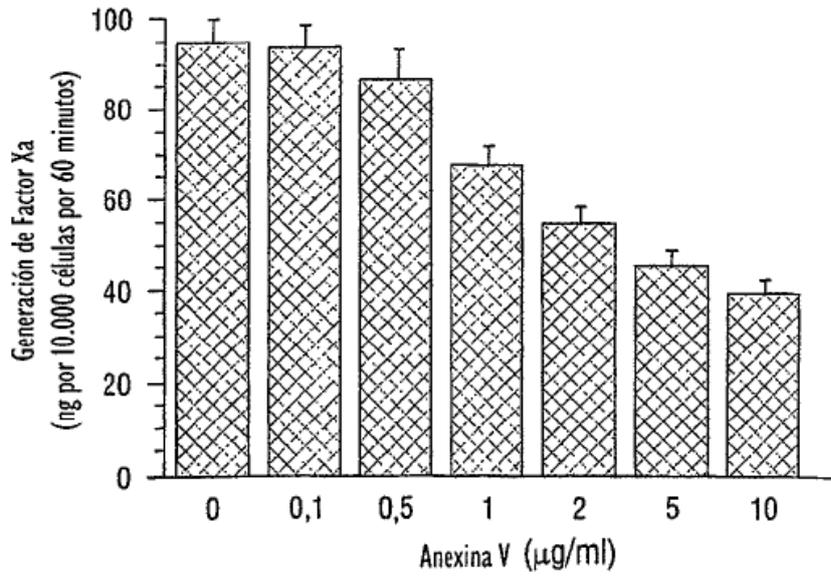


FIG. 3

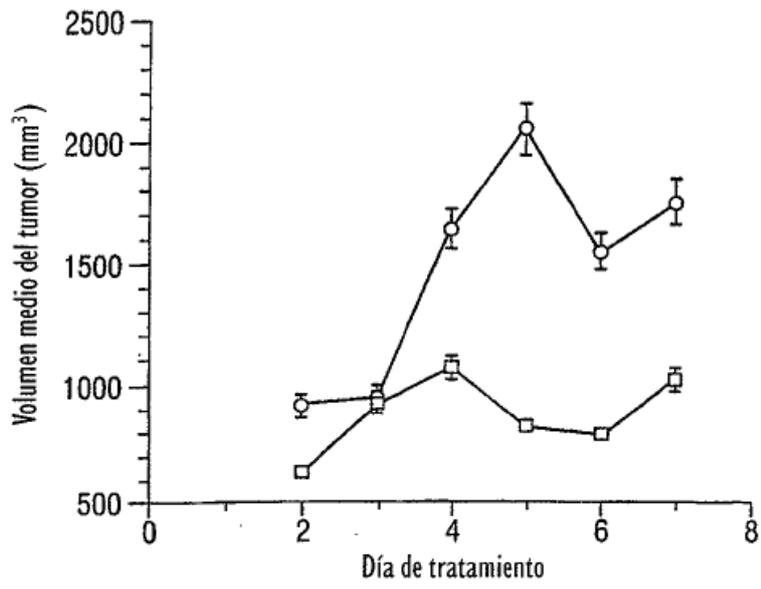


FIG. 4A

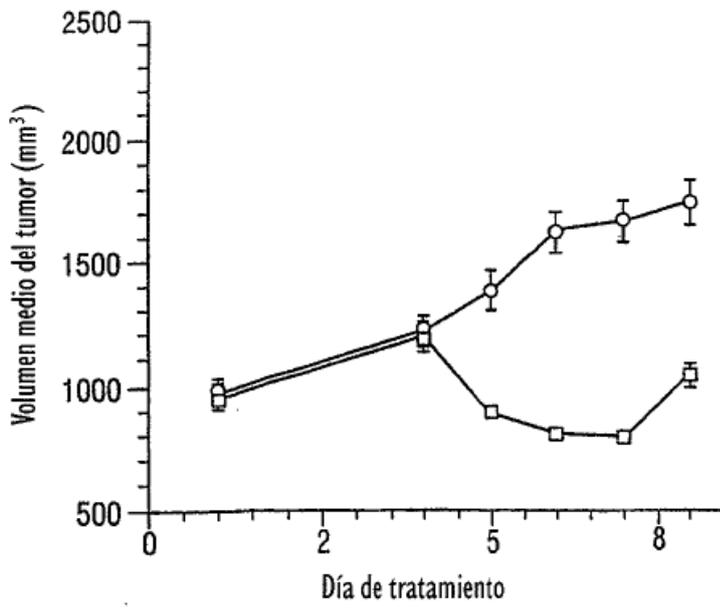


FIG. 4B