

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 543**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
C07K 14/775 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2006 E 06719706 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 1853631**

54 Título: **Construcciones de fusión a Fc de unión a fosfatidilserina y su uso terapéutico**

30 Prioridad:

24.01.2005 US 646333 P

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

05.04.2016

73 Titular/es:

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (50.0%)
201 West Seventh Street
Austin, TX 78701, US y
PEREGRINE PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

THORPE, PHILIP E;
LUSTER, TROY A y
KING, STEVEN W.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 565 543 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

Construcciones de fusión a Fc de unión a fosfatidilserina y su uso terapéutico

Antecedentes de la invención

5 La presente solicitud reivindica los derechos de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos en trámite junto con la presente con el nº de serie 60/646.333, presentada el 24 de enero de 2005.

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a los campos de la biología de la fosfatidilserina y al tratamiento de tumores e infecciones víricas. Proporciona nuevas construcciones sorprendentes, composiciones, su uso en métodos y combinaciones para el direccionamiento a la vascular del tumor y el tratamiento del cáncer, y para el tratamiento de infecciones víricas y otras enfermedades. La invención particular, nuevas construcciones de unión a fosfatidilserina con sorprendentes combinaciones de propiedades y conjugados de diagnóstico y terapéuticos de las mismas. Las nuevas construcciones se unen eficazmente a dianas de enfermedades relacionadas con fosfatidilserina y potencian su destrucción, y también pueden liberar agentes terapéuticos en sitios específicos, proporcionando de esta manera el uso de las construcciones en una serie de métodos para tratar cánceres, infecciones víricas y otras enfermedades.

2. Descripción de la técnica relacionada

20 La resistencia de las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos representa un problema significativo en la oncología clínica. Otro problema importante a abordar en el tratamiento de tumores es el deseo de una “destrucción total de células”, es decir, la destrucción de todas las células malignas denominadas clonogénicas que tienen la capacidad de crecer de forma incontrolada y reemplazar cualquier masa tumoral que pudiera eliminar la terapia. A pesar de ciertos avances en el campo, estas son dos de las razones principales por las que muchas formas frecuentes de cáncer humano siguen resistiéndose a una intervención quimioterapéutica eficaz.

25 Debido a la obtención de tratamientos en desarrollo que consiguen una destrucción total de células, ciertos tipos de tumores son más susceptibles 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, leucemia, generalmente han respondido más a la terapia quimioterapéutica que los tumores sólidos, tales como carcinomas.

30 Una razón de la susceptibilidad a la quimioterapia de los tumores de tejidos blandos y sanguíneos, es la mayor accesibilidad del linfoma y de las células leucémicas a la intervención quimioterapéutica. Dicho de forma sencilla, es mucho más difícil que la mayor parte de los agentes quimioterapéuticos alcance todas las células de una masa tumoral sólida que de un tumor blando o de un tumor sanguíneo, y por lo tanto, es mucho más difícil conseguir una destrucción total de las células. La mayoría de las veces el aumento de la dosis de los agentes quimioterapéuticos produce efectos secundarios tóxicos, que generalmente limitan la eficacia de los agentes antitumorales convencionales.

35 Otra estrategia del tratamiento de tumores es el uso de una “inmunotoxina”, en la que se usa un anticuerpo contra células tumorales para suministrar una toxina a las células tumorales. Sin embargo, en común con las estrategias quimioterapéuticas, la terapia con inmunotoxinas también tiene inconvenientes significativos cuando se aplica a los tumores sólidos. Por ejemplo, las células negativas para antígenos o deficientes en antígenos pueden sobrevivir y repoblar el tumor o producir metástasis posteriores. Otra razón de la resistencia de los tumores sólidos a las terapias que se basan en anticuerpos, es que la masa tumoral es generalmente impermeable a agentes macromoleculares tales como anticuerpos e inmunotoxinas. Tanto las distancias de difusión física como la presión intersticial dentro del tumor son limitaciones significativas para este tipo de terapia.

40 Una estrategia de tratamiento mejorada es actuar sobre el sistema vascular de los tumores sólidos. El actuar sobre los vasos sanguíneos de los tumores, en lugar de sobre las propias células tumorales, tiene ciertas ventajas ya que no es probable que conduzca al desarrollo de células tumorales resistentes, y que las células diana son fácilmente accesibles. Además, la destrucción de los vasos sanguíneos conduce a una amplificación del efecto antitumoral, ya que muchas células tumorales dependen de solo vaso para conseguir su oxígeno y sus nutrientes. En las patentes de Estados Unidos nº: 5.855.866, 5.965.132, 6.261.535, 6.051.230 y 6.451.312, se describen ejemplos de agentes que actúan sobre el sistema vascular (VTA, del inglés *vascular targeting agents*), que describen la liberación dirigida de agentes anticelulares y toxinas en marcadores del sistema vascular tumoral.

50 Otra versión eficaz de la estrategia que actúa sobre el sistema vascular es dirigir un factor de coagulación a un marcador expresado o adsorbido dentro del sistema vascular del tumor o estroma (Huang *et al.*, 1997; patentes de Estados Unidos nº: 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289, y 6.036.955). La liberación de coagulantes, en lugar de toxinas, en el sistema vascular tumoral tiene las ventajas adicionales de una menor inmunogenicidad e incluso un menor riesgo de efectos secundarios tóxicos. Como se desvela en la patente de Estados Unidos nº: 5.877.289, un factor de coagulación preferido que se usa en dichos “coagulandos” específicos de tumor, es una versión truncada de la proteína inductora de la coagulación humana, el factor tisular (TF), el mayor iniciador de la coagulación sanguínea.

Más recientemente, la fosfatidilserina (PS) se identificó como un marcador específico del sistema vascular tumoral (Ran *et al.*, 1998). Esto condujo al desarrollo de nuevos inmunoconjugados anti-PS para suministrar agentes anticelulares, toxinas y factores de coagulación a vasos sanguíneos tumorales (patentes de Estados Unidos n°: 6.312.694, 6.783.760 y 6.818.213). Además, se descubrió que los anticuerpos no conjugados con PS ejercían un efecto anticanceroso sin conectarse a ningún agente terapéutico, lo cual se dio a conocer como la estrategia de “anticuerpo desnudo” de fosfatidilserina que actúa sobre el sistema vascular tumoral y su tratamiento (patente de Estados Unidos n°: 6.406.693).

Aunque los métodos anteriores han promovido la técnica del tratamiento de tumores, se necesita desarrollar agentes adicionales terapéuticos y que actúen sobre el sistema vascular para ampliar el número y la eficacia de las opciones terapéuticas. Un avance importante sería la identificación de un grupo de agentes terapéuticos con propiedades anticancerosas y efectos terapéuticos en otros sistemas, tales como en el tratamiento de infecciones víricas. La generación de nuevas construcciones dirigidas que puede realizarse a partir de dos componentes humanos, particularmente los que no dependen del uso de anticuerpos para el direccionamiento, sería un desarrollo significativo, al proporcionar mayor seguridad. El diseño y el desarrollo de nuevos agentes que potencien la respuesta del propio paciente contra la enfermedad, es decir, que aumenten las funciones efectoras del hospedador, tendrían un gran valor para maximizar las respuestas terapéuticas, particularmente cuando pudiese hacerse uso de los mismos mecanismos contra el cáncer y otras enfermedades, tales como infecciones e infecciones víricas.

Sumario de la invención

La presente invención satisface las necesidades anteriores y otras necesidades de la técnica anterior proporcionando nuevas construcciones, composiciones, sus usos y combinaciones para actuar sobre el sistema vascular del tumor y para el tratamiento del cáncer, y para tratar infecciones víricas y otras enfermedades. La invención proporciona particularmente nuevas construcciones de unión a fosfatidilserina con sorprendentes combinaciones de propiedades, que se unen eficazmente a dianas de fosfatidilserina en enfermedades y potencian su destrucción, tal como por medio del aumento de las funciones efectoras del hospedador. También se proporciona una serie de composiciones conjugadas, en las que las nuevas construcciones están conectadas con agentes biológicos, de diagnóstico y terapéuticos adicionales, que pueden suministrarse específicamente en sitios con enfermedad. La invención también proporciona usos eficaces de las nuevas construcciones y conjugados y combinaciones de los mismos actuando sobre el sistema vascular tumoral, para el tratamiento de cánceres y para tratar infecciones víricas y otras enfermedades.

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una construcción como se expone en la reivindicación 1.

También se proporciona el uso de una construcción de la presente invención en terapia.

En un aspecto adicional se proporciona el uso de una construcción de la presente invención en el tratamiento o en la prevención de un cáncer.

También se proporciona el uso de la construcción de la presente invención para su uso en el tratamiento o en la prevención de una infección vírica o enfermedad.

Como se usan a lo largo de toda la solicitud, los términos “un”, “uno” y “una” se usan en el sentido de que significan “al menos uno(a)”, “al menos un(a) primer(a)”, “uno(a) o más” o “una pluralidad” de los componentes o etapas que se mencionan, excepto en casos en los que posteriormente se indique de forma específica un límite superior. Por lo tanto, una “construcción”, como se usa en el presente documento, significa “al menos una primera construcción”. Los límites y parámetros operativos de combinaciones, así como las cantidades de cualquier agente individual, serán conocidos por los expertos habituales en la materia a la luz de la presente divulgación.

Receptorcuerpos y betacuerpos: La invención proporciona en primer lugar, una serie de composiciones de construcciones de unión a fosfatidilserina, donde las construcciones comprenden al menos una primera proteína, polipéptido o receptor de unión a fosfatidilserina conectado operativamente a al menos una primera región Fc de anticuerpo. La adhesión de una proteína, polipéptido o “receptor” de unión a fosfatidilserina con una región Fc de “anticuerpo” da lugar a los términos “receptorcuerpo” y “receptorcuerpos”, que se usan en el presente documento para hacer referencia a las construcciones de Fc de unión a fosfatidilserina de la invención.

Las construcciones o los receptorcuerpos de la invención típicamente comprenden al menos una primera región Fc de anticuerpo conectada operativamente a al menos una primera proteína o polipéptido, receptor, ligando o péptido de unión a fosfatidilserina. En el presente documento, la expresión “proteína de unión a fosfatidilserina” se usa de manera concisa para hacer referencia a todas las proteínas, polipéptidos, receptores, ligandos y péptidos de unión a fosfatidilserina.

En muchas realizaciones, la “proteína de unión a fosfatidilserina” conservará la propiedad de unión a fosfatidilserina cuando se conecta a una región Fc de anticuerpo para formar una construcción de la invención. Naturalmente, la conservación de la función de unión a fosfatidilserina es importante en las construcciones destinadas al uso en el direccionamiento de la fosfatidilserina expuesta en sitios enfermos. Sin embargo, no todas las realizaciones de la

divulgación están limitadas a proteínas de unión a fosfatidilserina que conservan las propiedades de unión a fosfatidilserina cuando se conectan a una región Fc de anticuerpo.

En especial, la solicitud desvela una región Fc de anticuerpo ligada a "β2-glucoproteína I con muesca" donde la β2-glucoproteína I con muesca ya no se une a la fosfatidilserina (véase más adelante). Como se sabe que la β2-glucoproteína I con muesca es un inhibidor de la angiogénesis (publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos nº US 2003/0219406), la "Fc-β2 con muesca" de la presente divulgación será útil como inhibidor de la angiogénesis y tiene la ventaja de tener una mayor semivida y funciones efectoras adicionales, si es necesario.

Por consiguiente, la expresión "proteína de unión a fosfatidilserina" se refiere al origen de la proteína, polipéptido, receptor, ligando o péptido para su uso en las construcciones de la invención, a pesar de que algunas construcciones de la divulgación no se unirán a fosfatidilserina y seguirán teniendo usos terapéuticos y biológicos importantes, como se ha indicado anteriormente. Es decir, la β2-glucoproteína I se conoce como una proteína de unión a fosfatidilserina y la β2 con muesca ya no se une a fosfatidilserina.

En términos de la unión a fosfatidilserina, las proteínas de unión a fosfatidilserina originales y las proteínas de unión a fosfatidilserina de las construcciones resultantes se unirán a fosfatidilserina en condiciones biológicamente apropiadas, preferentemente en condiciones fisiológicas. Dichas propiedades de unión a fosfatidilserina opcionalmente pueden unirse opcionalmente a otros fosfolípidos aniónicos, en condiciones biológicamente apropiadas, preferentemente en condiciones fisiológicas.

En ciertas realizaciones preferidas, las proteínas de unión a fosfatidilserina de las construcciones sustancialmente no se unen al aminofosfolípido, fosfatidiletanolamina (PE). En otras realizaciones preferidas, las proteínas de unión a fosfatidilserina de las construcciones no muestran unión detectable a fosfatidiletanolamina.

En las construcciones de la divulgación puede usarse una gama de proteínas de unión a fosfatidilserina. Ciertas proteínas de unión a fosfatidilserina ejemplares que pueden usarse incluyen proteína C, proteína S, Factor II (protrombina), Factor V, Factor VII, Factor IX o Factor X.

Otras proteínas de unión a fosfatidilserina ejemplares que pueden usarse incluyen Mer, un receptor eliminador de unión a PS, integrina α₅β₃, el receptor del complemento CR3, el receptor del complemento CR4 y el receptor de fosfatidilserina, PSr (Balasubramanian y Schroit, 2003, véase la Tabla 2 en particular).

Otras proteínas de unión a fosfatidilserina ejemplares que pueden usarse en las construcciones de la divulgación son anexinas, preferentemente la anexina V, que se contemplan particularmente para su uso en ciertas realizaciones, tales como en conjugados, liposomas y similares, adicionales. Sin embargo, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona construcciones que comprenden una región Fc de anticuerpo conectada operativamente a al menos una primera proteína de unión a fosfatidilserina, donde dicha proteína de unión a fosfatidilserina no es una anexina o un fragmento de unión a fosfatidilserina de la misma, es decir, no es anexina V o un fragmento de unión a fosfatidilserina de la misma.

Son ejemplos preferidos de proteínas, polipéptidos y péptidos de unión a fosfatidilserina para su uso en las construcciones de la invención las proteínas, los polipéptidos y los péptidos Beta2-glucoproteína I (β2-glucoproteína I o β2GP1). La adhesión de una proteína, polipéptido o péptido de unión a β2-glucoproteína I con una región Fc de "anticuerpo" da lugar a los términos "betacuerpo" y "betacuerpos", que se usan en el presente documento para hacer referencia a las construcciones Fc-β2GP1 preferidas de la invención.

La β2GP1, anteriormente conocida como apolipoproteína H, es una glucoproteína plasmática de 50 kDa que se une a la fosfatidilserina. Se conocen las secuencias de ADN y de aminoácidos de la β2GPI de diversas especies de mamífero, incluyendo la β2GPI de ratón, rata, perro, vaca, chimpancé y humano. La β2GP1 tiene cinco dominios, I, II, III, IV y V, y la estructura de los dominios está conservada entre los mamíferos, como se representa por los dominios I-V de la β2GPI de ratón y de ser humano mostrada en las Figs. 18A y 18B, respectivamente.

La β2GP1 se une a la fosfatidilserina a través de su dominio C-terminal, el dominio V. Como se conoce la región (o regiones) de unión a fosfatidilserina y los lípidos del dominio V de la β2GPI, la parte de unión a fosfatidilserina de las construcciones de la invención solo debe contener "una región de unión a lípidos del dominio V de β2GPI".

Haciendo referencia ejemplar a la secuencia de aminoácidos de la β2GPI humana proporcionada en el presente documento como SEQ ID NO: 22 (Número de Registro 1C1ZA), como se muestra en la Fig. 18B, y la secuencia de la β2GPI de ratón homóloga mostrada en la Fig. 18A, las regiones de unión a lípidos del dominio V de la β2GPI incluyen un grupo de aminoácidos cargados positivamente (282-287) y una región hidrófoba conservada (311-317) responsable de la unión de β2GPI a fosfolípidos aniónicos (en cursiva y subrayados y en cursiva y doblemente subrayados en la FIG. 18B y en la FIG. 18A).

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la parte de unión a fosfatidilserina de las construcciones de la invención comprenderá un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos como la indicada por los aminoácidos 282-287 de la SEQ ID NO: 22 o un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos como la indicada por los aminoácidos 311-317 de la SEQ ID NO: 22. En otras realizaciones, la parte de unión a fosfatidilserina de las construcciones de la

invención comprenderá un péptido que abarca estas regiones, es decir, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 (de ser humano) o un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 (de ratón).

5 Como los péptidos y polipéptidos más pequeños anteriores pueden no ser óptimos, otras construcciones preferidas de la invención son aquellas en las que la parte de unión a fosfatidilserina es un polipéptido de β 2GPI que contiene el dominio V completo o intacto de la β 2GPI, incluyendo polipéptidos de β 2GPI que comprenden al menos el dominio V y los que contienen solo el dominio V.

10 Aunque no hay ningún problema con respecto a la seguridad de los métodos de la presente invención, los anticuerpos de los pacientes con el síndrome(s) antifosfolípido o APS (por *anti-phospholipid syndrome*) normalmente reconocen el dominio I de la β 2GPI (de Laa *et al.*, 2005a). Los anticuerpos que reconocen el dominio II de la β 2GPI no son patógenos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la parte de unión a fosfatidilserina de las construcciones de la invención puede comprender un polipéptido de β 2GPI que comprende al menos una región de unión a lípidos del dominio V de β 2GPI y que sustancialmente carece del dominio I de β 2GPI. En realizaciones preferidas, estas construcciones comprenderán un polipéptido de β 2GPI que comprende al menos el dominio V de la β 2GPI y que
15 carece sustancialmente del dominio I de la β 2GPI.

En el presente documento se proporcionan secuencias de ADN y de aminoácidos ejemplares de β 2GPI, incluyendo la secuencia de aminoácidos de la β 2GPI humana de la SEQ ID NO: 22 (nº de Registro 1C1ZA), como se muestra en la FIG. 18B, y la secuencia de aminoácidos de la β 2GPI de ratón homóloga mostrada en la FIG. 18A (la secuencia de un plásmido de expresión que codifica una construcción Fc- β 2GPI ejemplar de la invención también se proporciona como SEQ ID NO: 25). Haciendo referencia a estas figuras, a las secuencias y a los números de registro, opcionalmente a la luz de los ejemplos de trabajo del presente documento, los expertos habituales en la materia podrán preparar y usar una serie de polipéptidos que comprendan al menos el dominio V de la β 2GPI.
20

Como se ha indicado anteriormente, ciertos polipéptidos de β 2GPI preferidos comprenderán al menos el dominio V de β 2GPI y carecerán sustancialmente del dominio I de β 2GPI. Los polipéptidos de β 2GPI de acuerdo con esta descripción pueden comprender al menos el dominio IV y el dominio V de β 2GPI; comprender al menos el dominio III, el dominio IV y el dominio V de β 2GPI; o pueden comprender el dominio II, el dominio III, el dominio IV y el dominio V de β 2GPI.
25

Sin embargo, la presencia del dominio I de β 2GPI no será un inconveniente significativo en el uso de la invención, y puede ser conveniente para preparar construcciones en las que el polipéptido de β 2GPI comprende el dominio I, por ejemplo, para facilitar su preparación y uso. Por consiguiente, la invención comprende además construcciones en las que la parte de unión a fosfatidilserina es un polipéptido de β 2GPI de longitud completa, es decir, un polipéptido de β 2GPI que comprende el dominio I, el dominio II, el dominio III, el dominio IV y el dominio V. Un polipéptido de β 2GPI de longitud completa puede ser un polipéptido de β 2GPI humano que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.
30

35 En ciertas realizaciones de la invención, es importante que la construcción conserve las funciones de unión a fosfatidilserina cuando dicha al menos una primera proteína de unión a fosfatidilserina se une a la región Fc, particularmente cuando se pretende que la construcción se use actuando sobre la fosfatidilserina expuesta en sitios con enfermedad. Un ejemplo de la divulgación, cuando la unión a fosfatidilserina no es necesaria, es cuando al menos un primer polipéptido de β 2GPI con muesca está conectado a una región Fc de anticuerpo, que tendrá uso como un inhibidor de la angiogénesis.
40

Un polipéptido de β 2GPI "con muesca" es cuando en la secuencia de β 2GPI se ha efectuado una muesca o un corte enzimático (*nicked*), tal como mediante escisión con la enzima plasmina, en el sitio de escisión Lys317/Thr318. Una construcción que comprende un "polipéptido de β 2GPI con muesca", como se usa en el presente documento, puede contener solo un dominio V con muesca. Como alternativa, un polipéptido de β 2GPI con muesca puede comprender "al menos un dominio V con muesca", de tal forma que el polipéptido puede comprender un dominio V con muesca junto con uno cualquiera o más de los dominios IV, III, II y I.
45

50 Cuando se requiere conservar la unión a fosfatidilserina en una construcción de la invención, la presente invención proporciona características adicionales, sorprendentes y ventajosas, en relación con el uso de polipéptidos de β 2GPI unidos a una región Fc. Sorprendentemente, se descubrió que cuando una región Fc de anticuerpo se conectaba operativamente a dos polipéptidos de β 2GPI, el polipéptido de β 2GPI formaba un dímero en la construcción Fc- β 2GPI resultante y la construcción dimérica se unía eficazmente a fosfatidilserina.

De esta manera, son realizaciones adicionales de la invención aquellas en las que una región Fc de anticuerpo está conectada operativamente a dos polipéptidos de β 2GPI, donde cada polipéptido de β 2GPI comprende al menos el dominio V de β 2GPI. Más preferentemente, donde la región Fc de anticuerpo está conectada operativamente a dos polipéptidos de β 2GPI, comprendiendo cada uno al menos el dominio V de β 2GPI, y donde los polipéptidos de β 2GPI forman un dímero cuando se conectan a la región Fc. Preferentemente, donde la región FC de anticuerpo está conectada operativamente a dos polipéptidos de β 2GPI, comprendiendo cada uno al menos el dominio V de β 2GPI, y donde los polipéptidos de β 2GPI forman un dímero cuando se conectan a la región Fc y donde la
55

construcción resultante se une a fosfatidilserina, es decir, los polipéptidos de β 2GPI forman un dímero y se unen a fosfatidilserina cuando se conectan a la región Fc.

Además, preferentemente donde una región FC de anticuerpo está conectada operativamente a dos polipéptidos de β 2GPI; donde cada uno de los polipéptidos de β 2GPI comprende al menos el dominio V de β 2GPI y carece sustancialmente del dominio I de β 2GPI; y donde los polipéptidos de β 2GPI forman un dímero y se unen a la fosfatidilserina cuando se conectan a la región Fc. Además, preferentemente donde el primer y el segundo polipéptidos de β 2GPI, que comprenden cada uno al menos el dominio V de β 2GPI están unidos operativamente a la región FC de anticuerpo, formando de esta manera un dímero Fc- β 2GPI.

Sin embargo, aun cuando se requiere la unión a fosfatidilserina en una construcción de la divulgación que contiene β 2GPI, no es necesario que la construcción comprenda dos polipéptidos de β 2GPI, ni que cualquiera de dos o más polipéptidos de β 2GPI formen un dímero cuando se conectan a la región Fc. Por ejemplo, una región Fc puede conectarse a un solo polipéptido de β 2GPI, o a dos o más polipéptidos de β 2GPI que no forman un dímero cuando se conectan, y las construcciones resultantes pueden incluso usarse para unirse a fosfatidilserina, por ejemplo, mediante la formulación en un armazón que proporcione la valencia requerida. Son ejemplos de dichas formulaciones o armazones las nanopartículas, los liposomas y similares, que contienen las construcciones.

Para uso en seres humanos, cualquier proteína de unión a fosfatidilserina, tal como uno o más polipéptidos de β 2GPI, tiene que ser una proteína de unión a fosfatidilserina humana, tal como uno o más polipéptidos de β 2GPI humanos. Como también pueden usarse regiones FC humanas, esto tiene la ventaja de proporcionar un agente terapéutico totalmente humano, que reduciría los efectos secundarios, tales como los asociados con la inmunogenicidad.

Las regiones Fc para su uso en la invención proceden de un anticuerpo o "inmunoglobulina", incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales. La región Fc proporciona a la construcción resultante la capacidad de estimular las funciones efectoras del hospedador, para potenciar el tratamiento de la enfermedad.

Aunque se prefieren regiones Fc humanas para su uso en seres humanos, pueden usarse regiones Fc de otras fuentes, tales como de ratón, rata, hámster, conejo, mono y similares. Para el ensayo preclínico, tanto la región Fc como la proteína de unión a fosfatidilserina pueden seleccionarse de la misma especie animal en la que se va a realizar el ensayo preclínico, por ejemplo, una región Fc de ratón y un polipéptido de β 2GPI de ratón.

En la técnica, los anticuerpos típicamente se representan como moléculas con forma de "Y", que constan de cuatro polipéptidos - dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. La región de unión al antígeno o región "variable", que proporciona al anticuerpo su especificidad por el antígeno de unión, reside en los extremos de las cadenas ligera y pesada. El tratamiento de un anticuerpo con una proteasa puede escindir esta región, produciendo regiones, dominios o fragmentos Fab ("fragmento de unión a antígeno") y Fc (fragmento cristalizante) distintos. Por consiguiente, el término "Fc" se usa en la técnica para hacer referencia a una región, dominio o fragmento de anticuerpo, "sin una región, dominio o fragmento de unión a antígeno". Este es el significado deseado en la presente solicitud, de tal forma que la "región Fc" de las construcciones es una región, dominio o fragmento de anticuerpo "que no comprende una región, dominio o fragmento de unión a antígeno", es decir, que no se une específicamente a un antígeno. De esta manera, la invención proporciona construcciones con funciones efectoras no complicadas por problemas de direccionamiento.

Las regiones constantes determinan el mecanismo usado para destruir un antígeno, es decir, contienen determinantes de la función efectora. Los anticuerpos se dividen en cinco clases principales, IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, basándose en su estructura de región constante y función inmunitaria. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las clases de diferencia de las inmunoglobulinas se denominan μ , γ , α , δ y ϵ respectivamente. Varios de estos se dividen adicionalmente en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Las estructuras de subunidad de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Las regiones constantes de las cadenas pesadas γ , α y δ tienen tres dominios, mientras que la región constante de las cadenas pesadas μ y ϵ tienen cuatro dominios.

En las construcciones de la invención, se prefiere usar una región Fc de anticuerpo que tiene una bisagra de anticuerpo y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo CH2 y CH3. La bisagra de anticuerpo puede ser importante por consideraciones estructurales, tales como la flexibilidad, que puede facilitar la formación de un dímero cuando se unen dos o más proteínas de unión a fosfatidilserina, tales como dos o más polipéptidos de β 2GPI. La región de bisagra y el enlace de bisagra o la región de bisagra inferior también pueden proporcionar funciones efectoras. Aunque no es necesario, la región Fc de las construcciones también puede comprender al menos uno de los dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo C_{H1} o C_{H4}.

A la luz de las funciones efectoras proporcionadas, tales como la activación del complemento (unión a C1q), unión al receptor Fc, y la capacidad de estimular eficazmente procesos tales como ADCC y la lisis celular (Bruggemann et al., 1987; Riechmann et al. 1988; Clark, 1997; Padlan, 1994), actualmente se prefiere que la región Fc del anticuerpo sea una región Fc procedente de un anticuerpo IgG1 (γ 1) humano o IgG3 (γ 3) humano. Para un anticuerpo de ratón, la región Fc es, preferentemente, una región Fc de un anticuerpo IgG2a (γ 2a) de ratón o IgG2b (γ 2b) de ratón.

La región Fc del anticuerpo se conectará, asociará o conjugará con la al menos una primera proteína de unión a fosfatidilserina, tal como un polipéptido de β 2GPI, por cualquier medio operativo. Por ejemplo, mediante un enlace covalente directo, tal como mediante un reticulante químico, o donde la región Fc del anticuerpo y la proteína de unión a fosfatidilserina se preparan por expresión recombinante como una proteína de fusión. Puede usarse la conexión indirecta, tal como avidina-biotina y otros enlaces de este tipo.

La región Fc y la proteína de unión a fosfatidilserina se conectan operativamente o se conjugan, de tal forma que cada una de la región Fc y la proteína de unión a fosfatidilserina actúen cumplidamente, según se espera, después de la conexión y de la conjugación. Por ejemplo, conectado "operativamente" significa que la región Fc conserva sustancialmente las funciones efectoras deseadas, y la unión a fosfatidilserina cuando se desee, o la actividad antiangiogénica.

En ciertas realizaciones, la "conexión operativa" comprenderá la conexión de proteínas de unión a fosfatidilserina a la región Fc de una manera eficaz para permitir que las proteínas de unión a fosfatidilserina formen un dímero cuando se conectan, particularmente cuando las proteínas de unión a fosfatidilserina son dos o más polipéptidos de β 2GPI. En otras realizaciones, la conexión operativa producirá el agrupamiento de proteínas de unión a fosfatidilserina.

Cuando la proteína de unión a fosfatidilserina seleccionada es un polipéptido β 2GPI, y/o cuando la dimerización en la región Fc se desea particularmente, actualmente se prefiere usar la región Fc como la parte N-terminal de la construcción y conectar las proteínas de unión a fosfatidilserina o polipéptidos de β 2GPI para convertirse en la parte C-terminal de la construcción (FIG. 16).

Sin embargo, se contemplan otros esquemas para la conexión operativa, de tal forma que las proteínas de unión a fosfatidilserina o polipéptidos de β 2GPI se conviertan en la parte C-terminal de la construcción, es decir, se inserten en lugar de una región de unión a antígeno o en lugar de un dominio C_{H1} y una región de unión a antígeno. En dichas realizaciones, puede preferirse usar un péptido o enlazador químico que proporcione flexibilidad adicional a la construcción resultante, tal como, por ejemplo, un enlazador peptídico con cuatro restos de glutamina y un resto de serina (enlazador flexible G4S).

Después de la conexión operativa de los dos o más componentes, la construcción resultante presentará propiedades biológicas deseadas. Las propiedades biológicas deseadas ilustrativas en la construcción en su conjunto incluyen, unión a fosfatidilserina; estimulación de las funciones efectoras del hospedador; direccionamiento a fosfatidilserina en células activadas, tales como células endoteliales, células tumorales o células infectadas por virus, activadas, en división, dañadas o apoptóticas; localización en sitios diana, tales como vasos sanguíneos de tumores y células tumorales; y ejercer efectos terapéuticos, tales como efectos anticancerosos y/o antivíricos.

Las propiedades biológicas de la construcción resultante también incluirán, preferentemente, características de seguridad deseadas. Por ejemplo, preferentemente, la construcción no producirá daños, de un modo significativo, a células inactivas, inhibirá, de un modo significativo, reacciones de coagulación *in vitro*, producirá una trombosis significativa *in vivo* o tendrá actividades anticoagulantes de lupus significativas.

Por lo tanto, la presente invención proporciona nuevas construcciones de receptorcuerpo y betacuerpo eficaces en el tratamiento de cánceres, infecciones víricas y otras enfermedades. Estas construcciones incluyen las que se unen eficazmente a dianas de fosfatidilserina en enfermedades y potencian su destrucción al aumentar las funciones efectoras del hospedador.

Conjugados adicionales, composiciones y kits: sin embargo, aunque es muy eficaz de forma individual, la presente invención también proporciona además conjugados, composiciones y métodos relacionados en los que las construcciones, receptorcuerpos y betacuerpos de la invención se conectan adicionalmente a otros agentes biológicos, de diagnóstico y terapéuticos adicionales. Dichos "conjugados adicionales" de la invención son "agentes trifuncionales" ya que tienen las tres propiedades de unirse a fosfatidilserina, estimular las funciones efectoras del hospedador y liberar el agente terapéutico, de diagnóstico o biológico conectado a la diana deseada.

En las siguientes descripciones de los conjugados, composiciones, agentes farmacéuticos, combinaciones, cocteles, kits, primer y segundo usos médicos y todos los métodos de acuerdo con la invención, las "construcciones" incluyen todas las construcciones, receptorcuerpos y betacuerpos de la invención primaria descrita anteriormente.

En las realizaciones adicionales de conjugados, la invención proporciona además nuevas categorías de conjugados, composiciones, kits y métodos en los que la construcción original, el receptorcuerpo o betacuerpo está conectado operativamente a un agente biológico, de diagnóstico o terapéutico "adicional" o exógeno. El agente biológico, de diagnóstico o terapéutico "exógeno" es "un agente distinto del dominio Fc ya presente en la construcción original".

El "agente biológico" adicional o exógeno no necesita ser directamente un agente terapéutico o de diagnóstico. Por ejemplo, como la invención puede usarse en relación con profármacos, incluyendo realizaciones de ADEPT, el agente biológico puede ser un agente, preferentemente una enzima, que escinde un profármaco sustancialmente inactivo para liberar un fármaco sustancialmente activo. Dichos agentes y enzimas se describen más adelante en relación con el profármaco y realizaciones del método de ADEPT.

En lo referente a “agentes de diagnóstico”, son agentes de diagnóstico preferidos para la conexión, agentes de diagnóstico, de formación de imágenes o detectables *in vivo*. Dichos conjugados de diagnóstico pueden usarse para formar imágenes de células preapoptóticas y apoptóticas en una serie de enfermedades, en la formación de imágenes y el tratamiento combinado de tumores, y en métodos para usar la invención como un marcador secundario para monitorizar la quimioterapia. Los agentes de diagnóstico preferidos incluyen un compuesto detectable por rayos X, un ion radioactivo, un isótopo de resonancia de espín magnético nuclear y un agente CEST o paraCEST.

Los marcadores detectables adecuados incluyen 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 spin 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.

En lo que se refiere a “agentes terapéuticos”, ciertos agentes terapéuticos preferidos son agentes citotóxicos, citoestáticos, anticelulares y anticancerosos. Por lo tanto, una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención puede unirse a al menos un primer agente quimioterapéutico, agente antiangiogénico, agente de inducción de la apoptosis, fármaco antitubulina, antibiótico, radioisótopo o coagulante.

Dentro de los agentes citotóxicos, actualmente se prefieren las toxinas de ricina, gelonina, abrina, de la difteria, pseudomonas y toserfina. De las citocinas y quimiocinas, son agentes actualmente preferidos IL-2, IL-12, TNF- α , interferón α (IFN- α) IFN- β , IFN- γ y LEC (quimiocina expresada en hígado). También se prefieren actualmente inhibidores de la ATPasa de tipo V, tales como salicililalamida, concanamina o bafilomicina, así como inhibidores de la síntesis de proteínas, tales como simberina, pederina e irciniastatina A.

Son agentes anticancerosos actualmente preferidos el taxol, docetaxel, paclitaxel, cisplatino, gemcitabina, una combretastatina, doxorubicina y adriamicina. También se prefieren actualmente radioisótopos de arsénico como agentes adicionales o exógenos. En cuanto a coagulantes, actualmente se prefiere el factor tisular truncado.

Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención también puede conectarse operativamente además a un agente o fármaco antivírico, tal como un inhibidor nucleosídico de la transcriptasa inversa, un inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa inversa o un inhibidor de proteasa. Actualmente, como agentes antivíricos exógenos se prefieren AZT, cidofovir y ribavirina.

De nuevo, en las realizaciones adicionales de conjugados, el término “conjugado” se usa para definir la asociación operativa de la construcción original, receptorcuerpo o betacuerpo y el agente adicional, y no pretende referirse únicamente a cualquier tipo de asociación operativa, y particularmente no se limita a la “conjugación” química. De nuevo pueden usarse proteínas de fusión recombinantes. Será adecuado cualquier modo de conexión, siempre que la proteína de unión a fosfatidilserina, la región Fc y el agente, o los agentes, conectados adicionales, actúen cumplidamente, como se desea, particularmente cuando se liberan en un sitio diana *in vivo*.

Cuando se usa un polipéptido β 2GPI como la proteína de unión a fosfatidilserina de una construcción, generalmente se preferirá no conectar ningún agente adicional en el dominio V de β 2GPI, o al menos no dentro de la región o regiones de unión a lípidos del dominio V. Por tanto, en ciertas realizaciones, tales como las ilustradas en la FIG. 16, se prefiere, por simplicidad, conectar operativamente cualquier agente adicional a la parte N-terminal de la construcción, es decir, hacia la bisagra o área C_{H2}.

La invención también proporciona composiciones que comprenden una cantidad biológicamente eficaz de al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo. Las composiciones preferidas son “composiciones farmacéuticas” que comprenden, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, una cantidad biológica o terapéuticamente eficaz de al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos. Estas composiciones están destinadas al uso farmacéutico, farmacológico, terapéutico, médico y veterinario, preferentemente para el uso en el tratamiento de cánceres e infecciones víricas.

Las composiciones farmacéuticas incluyen las formuladas para administración parenteral, tales como para administración intravenosa, o para administración como un liposoma o como un aerosol. Las formulaciones de aerosol son particularmente adecuadas para el tratamiento de infecciones víricas. Las “cantidades biológica o terapéuticamente eficaces” en las composiciones farmacéuticas son cantidades eficaces para tratar una enfermedad o un trastorno, particularmente cantidades eficaces para tratar cánceres o una infecciones víricas.

Aunque son exclusivamente eficaces, las diversas construcciones, receptorcuerpos o betacuerpos de la invención, y sus conjugados, y los métodos relacionados de la invención, también pueden usarse ventajosamente en combinación con otros agentes y terapias para proporcionar composiciones, agentes farmacéuticos y kits combinados de la invención y métodos de tratamiento combinados relacionados. Por lo tanto, en otras realizaciones, la invención proporciona además composiciones, métodos y kits combinados particulares, por ejemplo, para el tratamiento de cánceres y para el tratamiento antivírico, que se han seleccionado porque, de manera sorprendente, funcionan bien juntos, como se explica con más detalle en el presente documento.

De esta manera, los aspectos de la invención incluyen además composiciones, composiciones farmacéuticas, combinaciones, mezclas, medicamentos y/o cócteles medicinales de agentes, que comprenden al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos, en combinación con una cantidad biológica o terapéuticamente eficaz de al menos un segundo agente biológico. Todas estas combinaciones comprenden preferentemente “cantidades biológica o terapéuticamente eficaces combinadas”, tales como una cantidad combinada eficaz para tratar una enfermedad, tal como para tratar un cáncer o una infección vírica.

En las composiciones, aunque no necesariamente, el “al menos un segundo agente biológico” será, con frecuencia, un agente de diagnóstico o terapéutico. Por ejemplo, el segundo agente biológico puede ser un componente de una composición farmacéutica, tal como un agente de dispersión o un agente de retraso de la absorción. Otros agentes biológicos, tales como agentes para fabricar conjugados y profármacos para su uso en métodos de profármacos y ADEPT, y agentes de diagnóstico, preferentemente se mantienen en combinación, pero por separado, de la primera composición de la invención y por lo tanto se analizan más adelante haciendo referencia a los kits de la invención. “En combinación, pero por separado” significa muy cerca entre sí, pero sin formar parte de la misma composición, tal como sin formar parte de la misma solución o composición farmacéutica.

En cuanto al “al menos un segundo agente terapéutico”, el término “segundo” hace referencia a la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o conjugado de los mismos, que es el “primer” agente terapéutico.

Cuando la invención pretende usarse en el tratamiento de cánceres, el al menos un segundo agente terapéutico será, preferentemente, “al menos un segundo agente anticanceroso distinto”. El segundo agente anticanceroso, para su uso combinado, puede ser un agente radioterapéutico, quimioterapéutico, antiangiogénico o inductor de la apoptosis, citocinas o anticuerpos o una construcción de anticuerpo-agente terapéutico que se une a una célula tumoral, a un antígeno intracelular liberado de una célula tumoral necrótica o a un componente del sistema vascular del tumor (es decir, inmunotoxinas anticancerosas o coagulandos). La expresión “agente quimioterapéutico”, como se usa en el presente documento, incluye genes, vectores, construcciones antisentido y ribozimas.

Ciertos segundos agentes anticancerosos preferidos para uso combinado son los que complementan o potencian el efecto terapéutico de la primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o conjugado de los mismos, y/o los seleccionados para un tipo de tumor o paciente particular. Los “agentes terapéuticos que complementan o potencian el efecto terapéutico” incluyen agentes radioterapéuticos, agentes potenciadores de la permeabilidad vascular, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de la apoptosis, ciertas citocinas, inmunotoxinas contra células tumorales, así como agentes quimioterapéuticos seleccionados. Los “agentes quimioterapéuticos seleccionados” actualmente preferidos son agentes quimioterapéuticos con efectos antiangiogénicos, como los mostrados en la Tabla E; agentes quimioterapéuticos que inducen la apoptosis, como los mostrados en la Tabla F; agentes inductores del flujo de calcio, citocinas inflamatorias, H₂O₂, trombina y fármacos antitubulina de la familia de la combretastatina. La doxorubicina, el etopósido y la actinomicina D son los más preferidos, siendo el docetaxel el más preferido.

Cuando la invención se destina para el uso en el tratamiento vírico, el al menos un segundo agente terapéutico será preferentemente “al menos un segundo agente antivírico distinto”. Los segundos agentes antivíricos para uso combinado pueden seleccionarse de cualquiera agente antivírico o fármaco disponible en el momento de llevar a la práctica la invención, incluyendo la serie de agentes y fármacos antivíricos descritos en el presente documento para conectarse a las construcciones de la invención. Como ejemplo, fármacos antirretrovíricos, tales como NTRI, inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa e inhibidores de proteasa, agentes antivíricos como se indica en la Tabla G, y preferentemente AZT o cidofovir.

La invención proporciona además un liposoma, un vehículo lipídico, un complejo, una mezcla, un agregado multimolecular de estructura supramolecular o un sistema de liberación de fármacos basado en lípidos, que comprende al menos una primera construcción, receptorcuerpo, betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos. El liposoma o la composición de tipo liposoma, puede estar en forma de una monocapa, bicapa, un agregado multimolecular, una vesícula, hélice, un disco, tubo, una fibra, un torus, una fase hexagonal, una fase de gel, una fase líquida cristalina, un agregado multimolecular líquido cristalino, una micela, una micela inversa, microemulsión, emulsión, un microdepósito, glóbulo de aceite, glóbulo de grasa, glóbulo de cera y/o una partícula coloidal.

Los liposomas o composiciones de tipo liposoma generalmente comprenden una “membrana externa” o fase acuosa voluminosa y un “núcleo central” o fase acuosa interna. En realizaciones preferidas, el liposoma o la composición de tipo liposoma es un liposoma furtivo, un vehículo lipídico, un complejo, una mezcla, un agregado multimolecular de estructura supramolecular o un sistema de liberación de fármacos basado en lípidos. Los liposomas “furtivos o encubiertos” y las composiciones de tipo liposoma comprenden una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer agente de encubrimiento en asociación operativa con la membrana externa. Un “agente de encubrimiento” es un componente que aumenta la semivida biológica de un liposoma o composición de tipo liposoma cuando se asocia operativamente con la membrana externa del liposoma o composición de tipo liposoma. En “asociación operativa”, la membrana externa del liposoma o de la composición de tipo liposoma está, preferentemente, “recubierta” con el uno o más agentes de encubrimiento.

Los agentes de encubrimiento eficaces incluyen una serie de polímeros hidrófilos biocompatibles, tales como poliaminas, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poliláctico-poliglicólico (PLGA), polipéptidos y materiales relacionados. Un agente de encubrimiento preferido es el polietilenglicol (PEG), donde los liposomas furtivos resultantes se denominan "liposomas PEGilados".

- 5 Los liposomas preferidos de la invención son liposomas furtivos o PEGilados en los que al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos, está asociado operativamente con la membrana externa del liposoma, preferentemente donde el liposoma está "recubierto" con el mismo.

- 10 Los liposomas particularmente preferidos son liposomas tales como "recubiertos" y encubiertos o PEGilados en los que al menos un primer agente terapéutico, tal como un agente antivírico o preferentemente un agente anticanceroso, está asociado operativamente con el liposoma o disperso en la formulación liposomal. Preferentemente, el agente terapéutico, antivírico o anticanceroso está asociado operativamente con, o se mantiene dentro, del núcleo central del liposoma. Son agentes anticancerosos ejemplares los radionúclidos y agentes quimioterapéuticos, tales como fármacos antitubulina, docetaxel y paclitaxel, siendo el docetaxel el preferido.

- 15 Otras realizaciones de la invención se refieren a kits que comprenden, en al menos una primera composición o recipiente, al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos, en combinación con una cantidad biológica o terapéuticamente eficaz de al menos un segundo agente, componente o sistema biológico.

- 20 Los "segundos agentes, componentes o sistemas biológicos" no están limitados a agentes terapéuticos o de diagnóstico. Por ejemplo, los segundos agentes, componentes o sistemas biológicos pueden comprender componentes para la modificación de la construcción y/o para conectar otros agentes. Ciertos segundos agentes, componentes o sistemas biológicos preferidos son profármacos o componentes para fabricar y usar profármacos, incluyendo componentes para fabricar el propio profármaco y componentes para adaptar las construcciones de la invención para que actúen en dichas realizaciones de profármaco o ADEPT.

- 25 El al menos un "segundo agente, componente o sistema de diagnóstico" puede ser un agente, componente o sistema de diagnóstico, directa o indirectamente detectable mediante un ensayo de diagnóstico *in vitro*. Los "agentes indicadores directamente detectables *in vitro*" incluyen radiomarcadores, agentes indicadores detectables por inmunofluorescencia y luciferasa. Los "agentes indicadores indirectamente detectables *in vitro*" actúan junto con uno o más agentes exógenos adicionales, tales como enzimas detectables que producen un producto coloreado cuando entran en contacto con un sustrato cromogénico. Estos incluyen "anticuerpos secundarios", que están conectados a un agente detectable directo o indirecto, tal como un radiomarcador o enzima, y "sistemas de detección de anticuerpos secundarios y terciarios" en los que el anticuerpo terciario está conectado al agente detectable.

- 30 Son kits de diagnóstico preferidos de la invención los que comprenden un agente, componente o sistema de diagnóstico detectable por diagnosis o formación de imágenes *in vivo*. Una ventaja de las realizaciones de formación de imágenes de la invención es que la misma construcción puede usarse para formar imágenes y para el tratamiento. Por lo tanto, la invención proporciona kits y medicamentos que comprenden:

- 35 (a) una primera composición farmacéutica que comprende una cantidad, eficaz desde el punto de vista del diagnóstico, de una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, conectada operativamente a un marcador o agente de diagnóstico detectable; y
- 40 (b) una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, preferentemente una cantidad terapéuticamente eficaz de la misma construcción, receptorcuerpo o betacuerpo usado en la primera composición farmacéutica.

- 45 Para su uso en realizaciones terapéuticas, los kits comprenderán "al menos un segundo agente terapéutico". Preferentemente, dichos kits comprenden una cantidad biológica o terapéuticamente eficaz combinada de al menos los dos agentes especificados, tales como cantidades combinadas eficaces para inhibir la proliferación o replicación vírica, o para tratar una enfermedad tal como un cáncer o un infecciones víricas.

- 50 En términos del tratamiento de cánceres, los kits de la invención incluyen anticuerpos para su uso en combinación con profármacos y ADEPT. En dichas composiciones, la construcción, el receptorcuerpo o betacuerpo se "modifica para proporcionar una capacidad de conversión o enzimática". Preferentemente, la construcción, el receptorcuerpo o betacuerpo se asocia operativamente con, preferentemente, se une covalentemente o se conjuga con, al menos un primer agente o enzima de conversión capaz de convertir al menos un profármaco en la forma activa del fármaco.

- 55 La construcción enzimática o conjugada con enzimas, el receptorcuerpo o betacuerpo se combinará con una formulación inicialmente distinta del "profármaco". El profármaco será una forma inactiva o débilmente activa de un fármaco que se convierte en la forma activa del fármaco tras el contacto con la capacidad enzimática, función de conversión o enzima asociada con la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención.

Por consiguiente, se proporcionan kits que comprenden, preferentemente en composiciones y/o en envases distintos:

- 5 (a) una cantidad biológicamente eficaz de al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, donde la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo está asociada operativamente con, ligada covalentemente o conjugada con, al menos una primera enzima; y
- (b) una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer profármaco sustancialmente inactivo que se convierte en un fármaco sustancialmente activo mediante la enzima asociada con, ligada a o conjugada con, la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo.

10 Las enzimas adecuadas que escinden un profármaco sustancialmente inactivo para liberar un fármaco sustancialmente activo incluyen arilsulfatasa, serratia proteasa, termolisina, subtilisina, una carboxipeptidasa, una catepsina, D-alanilcarboxipeptidasa, β -galactosidasa, neuraminidasa, β -lactamasa, penicilina amidasa y citosina desaminasa.

15 Otros agentes distintos de los profármacos, el al menos un segundo agente anticanceroso puede ser cualquiera de los segundos agentes anticancerosos descritos anteriormente en relación con las composiciones anticancerosas combinadas de la invención. Para tratar las infecciones víricas, el al menos un segundo agente antivírico también puede ser cualquiera de los segundos agentes antivíricos descritos anteriormente en relación con las composiciones antivíricas combinadas de la invención. Sin embargo, los "kits" pueden comprender los al menos dos agentes mencionados "en combinación, pero por separado", proporcionando de esta manera incluso más flexibilidad en la selección de los agentes.

20 Por tanto, los kits de la invención pueden comprender cantidades biológica o terapéuticamente eficaces combinadas de al menos los dos agentes especificados dentro de un solo envase o medio de envase, o dentro de distintos envases o medios de envase. Los kits también pueden comprender instrucciones para usar los agentes biológicos y terapéuticos incluidos en los mismos. También pueden incluirse en combinación componentes de formación de imágenes, pero por separado, con los kits terapéuticos.

25 **Tratamiento de Tumores y Métodos Relacionados:** la presente invención proporciona diversos usos para una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos. En relación a todos los métodos, los términos "un" y "uno(a)" se usan para hacer referencia a "al menos un, uno(a)", "al menos un, uno(a) primer(o) (a)", "uno(a) o más" o "una pluralidad" de etapas en los métodos mencionados, excepto cuando se indique específicamente. Esto es particularmente relevante para las etapas de administración en los métodos de tratamiento.

30 De esta manera, no solo pueden emplearse diferentes dosis con la presente invención, sino diferentes números de dosis, por ejemplo, pueden usarse inyecciones o inhalaciones, hasta e incluyendo múltiples inyecciones o inhalaciones.

Se proporcionan diversos métodos y usos *in vitro* útiles que tienen implicaciones biológicas importantes. Por tanto se proporcionan métodos de, y usos en, la unión de fosfatidilserina, que generalmente comprenden poner en contacto de manera eficaz una composición que comprende fosfatidilserina con al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos. La "puesta en contacto" se realiza en condiciones eficaces para permitir la formación de complejos unidos, y para detectar cualquiera de los complejos así formados.

35

Los métodos de detección y usos pueden utilizarse en relación con muestras biológicas, por ejemplo, en diagnóstico para apoptosis, tumores y células infectadas con virus, y también se proporcionan kits de diagnóstico basados en los mismos. Estos métodos y kits proporcionan usos específicos y convincentes para las construcciones, receptorcuerpos, betacuerpos y conjugados de la presente invención. Por ejemplo, actualmente la anexina V se usa en métodos y kits para detectar células apoptóticas. Sin embargo, la anexina V se une a fosfatidiletanolamina así como a fosfatidilserina, mientras que las construcciones, receptorcuerpos y betacuerpos y conjugados de la presente invención se unen a fosfatidilserina con unión no significativa, o preferentemente no detectable, a fosfatidiletanolamina. Por tanto, las construcciones de la invención están más capacitadas para poder detectar específicamente fosfatidilserina en métodos de detección y en ensayos de diagnóstico.

40

45

Adicionalmente la invención proporciona muchos métodos y usos útiles *in vivo*. Por ejemplo, métodos para dirigirse al sistema vascular de tumores, formación de imágenes de tumores y tratamiento basado en la localización de fosfatidilserina, que es un marcador direccionable accesible y estable del sistema vascular de tumores. Las construcciones, receptorcuerpos y betacuerpos de la invención y conjugados de los mismos, se localizan específicamente en el sistema vascular de tumores sólidos después de la administración a un animal con un tumor. Por tanto, la translocación de la fosfatidilserina a la superficie de las células endoteliales vasculares tumorales se produce, al menos en una parte significativa, independientemente de la apoptosis y muerte celular completas, de tal manera que la fosfatidilserina se expone en células endoteliales vasculares morfológicamente intactas.

50

55

Los métodos y usos pueden realizarse *in vitro* e *in vivo*, encontrándose, en el último caso, los tejidos o las células en un animal y administrándole, al mismo, la construcción, el receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o sus conjugados. Cuando los tejidos o las células se mantienen *ex vivo*, la presente invención tiene utilidad en programas

de descubrimiento de fármacos. Los ensayos de exploración *in vitro*, con controles positivos y negativos fiables, son útiles como una primera etapa en el desarrollo de fármacos. Cuando los tejidos o las células se encuentran en un animal o paciente, la composición se administra al animal como una forma de terapia.

5 Las terapias antiangiogénicas o antivascuales se proporcionan en términos de animales y pacientes que tienen, o que están en riesgo de desarrollar, cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por angiogénesis o vascularización, no deseada, inapropiada, aberrante, excesiva y/o patológica. Los métodos y usos de la presente invención están particularmente destinados para su uso en animales y en pacientes que tienen, o que están en riesgo de desarrollar, cualquier forma de tumor vascularizado; degeneración macular, incluyendo degeneración macular relacionada con la edad; artritis, incluyendo artritis reumatoide; aterosclerosis y placas ateroscleróticas; 10 retinopatía diabética y otras retinopatías; hiperplasias tiroideas, incluyendo enfermedad de Grave; hemangioma; glaucoma neovascular y soriasis. En determinadas realizaciones de la divulgación, se preferirá el uso de una región Fc conectada operativamente a un polipéptido β 2GP1, que comprende el dominio V con muesca, para su uso en la inhibición de la angiogénesis.

15 Como se divulga en las Patentes de Estados Unidos nº 5.712.291 y 6.524.583, cada uno de los grupos de tratamiento anteriores son por medios no exhaustivos de los tipos de afecciones que van a tratarse con la presente invención. Las Patentes de Estados Unidos nº 5.712.291 y 6.524.583 identifican diversas otras afecciones que pueden tratarse eficazmente una vez que se ha desvelado y reivindicado una categoría definida de compuestos; y muestran que es posible tratar otras enfermedades mediante datos que proceden únicamente de un solo sistema modélico.

20 Además del tratamiento de enfermedades vasculares, son aspectos importantes y unificados de la presente invención las composiciones y los métodos para el tratamiento del cáncer. Dichos métodos comprenden administrar a un animal o a un paciente con cáncer, o que está en riesgo de desarrollarlo, una cantidad biológica o terapéuticamente eficaz de al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos.

25 Los métodos de tratamiento del cáncer y usos de la invención son adecuados para el tratamiento de todas las formas de cáncer, incluyendo animales y pacientes que tienen, o que están en riesgo de desarrollar, un tumor sólido vascularizado, un tumor metastásico o metástasis de un tumor primario. Los métodos de tratamiento del cáncer de la invención no se basan exclusivamente en ejercer efectos antivascuales, tales como actuar sobre la fosfatidilserina expuesta en la superficie luminal de las células endoteliales de vasos sanguíneos tumorales, ya que las 30 construcciones de la invención también pueden actuar sobre la fosfatidilserina expuesta en la superficie de células tumorales. Los métodos de la invención ejercen preferentemente un efecto anticanceroso sin causar complicaciones trombóticas significativas.

35 Cualquiera de la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo, no conjugado, de la invención original, o un conjugado adicional de los mismos, puede usarse en los aspectos de tratamiento del cáncer de la invención. En cuanto al uso de inmunoconjugados, la invención proporciona métodos para suministrar a los tumores agentes de diagnóstico o terapéutico seleccionados. Dichas realizaciones comprenden administrar a un animal o a un paciente que tenga un tumor, una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer conjugado en el que un agente de diagnóstico o terapéutico está conectado operativamente a una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención.

40 La invención también proporciona métodos de diagnóstico, pronóstico, formación de imágenes de tumores, y métodos relacionados, usando una construcción, un receptorcuerpo o betacuerpo de la invención para detectar células preapoptóticas y apoptóticas. Dichos métodos pueden usarse como un marcador secundario para monitorizar el progreso de otro tratamiento, particularmente quimioterapia, o para formar una imagen de un tumor antes del tratamiento.

45 El uso de la invención como un marcador secundario para monitorizar el progreso del tratamiento del cáncer, particularmente quimioterapia, comprende:

- (a) someter a un animal o a un paciente con un tumor, a al menos un primer tratamiento diseñado para ejercer un efecto antitumoral; y
- (b) administrar posteriormente al mismo animal o paciente una cantidad eficaz desde el punto de vista del diagnóstico, de al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, 50 conectado operativamente a un marcador detectable o a un agente de diagnóstico, formando de este modo una imagen detectable del tumor, preferentemente una imagen de células tumorales preapoptóticas o apoptóticas o células endoteliales vasculares tumorales dentro del tumor; y preferentemente
- (c) analizar la imagen detectable del tumor, preferentemente la imagen de las células tumorales preapoptóticas o apoptóticas o células endoteliales vasculares tumorales dentro del tumor, evaluando de 55 este modo el progreso o la eficacia del al menos un primer tratamiento diseñado para ejercer un efecto antitumoral.

Los métodos combinados de formación de imágenes y de tratamiento del cáncer comprenden:

- (a) la formación de una imagen de un tumor administrando a un animal o a un paciente que tiene un tumor, una cantidad mínima o eficaz, desde el punto de vista del diagnóstico, de al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, conectado operativamente a un marcador detectable o a un agente de diagnóstico, formando de este modo una imagen detectable del tumor; y
- 5 (b) posteriormente administrar al mismo animal o paciente una cantidad terapéuticamente optimizada o eficaz de al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos, causando de este modo un efecto antitumoral.

Dentro de los métodos de tratamiento del cáncer de la invención, ésta proporciona adicionalmente métodos de tratamiento con profármacos, que generalmente comprenden:

- 10 (a) administrar a un animal o a un paciente con un tumor una primera composición farmacéutica que comprende una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, asociado operativamente con, ligado mediante enlace covalente, o conjugado con, al menos una primera enzima; en la que la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo se localiza en el tumor después de la administración y
- 15 (b) posteriormente, después de un periodo de tiempo eficaz, administrar al animal o al paciente, al menos una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un profármaco sustancialmente inactivo; en el que el profármaco se convierte en un fármaco sustancialmente activo mediante la enzima asociada con, ligada a o conjugada con, la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo localizado en el tumor.

- 20 La presente invención proporciona una serie de métodos de combinación para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un animal o a un paciente con cáncer una cantidad combinada terapéuticamente eficaz de al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos, y al menos un segundo agente terapéutico o anticanceroso distinto.

25 En términos generales, el al menos un segundo agente anticanceroso puede administrarse al animal o al paciente antes, durante o después de la administración de la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o conjugado de los mismos. El al menos un segundo agente anticanceroso puede administrarse al animal o al paciente "sustancialmente de manera simultánea" con la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o conjugado de los mismos; tal como a partir de una sola composición farmacéutica o a partir de dos composiciones farmacéuticas administradas estrechamente.

30 Como alternativa, el al menos un segundo agente anticanceroso puede administrarse al animal o al paciente a un tiempo secuencial con respecto a la administración de la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o conjugado de los mismos. "A un tiempo secuencial", como se usa en el presente documento, significa "escalonado", de tal manera que el al menos un segundo agente anticanceroso se administra al animal o al paciente en un tiempo distinto a la administración de la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o conjugado de los mismos.

35 En la administración secuencial, los dos agentes se administran en tiempos eficazmente separados para permitir que los dos agentes ejerzan sus efectos terapéuticos respectivos, es decir, se administran a "intervalos de tiempo biológicamente efectivos". El al menos un segundo agente anticanceroso puede administrarse al animal o al paciente a un tiempo biológicamente eficaz antes de la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o conjugado de los mismos, o a un tiempo biológicamente eficaz posterior al del agente terapéutico.

40 Cualquier agente terapéutico o anticanceroso puede usarse como el segundo agente terapéutico o anticanceroso en los métodos de tratamiento del cáncer combinados de la invención, incluyendo cualquiera de los agentes terapéuticos o anticancerosos descritos anteriormente en relación con las composiciones anticancerosas de la invención. Los agentes preferidos son aquellos que complementan o potencian los efectos terapéuticos de la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o conjugado de los mismos, tales como agentes potenciadores de la permeabilidad vascular, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de la apoptosis, agentes inductores del flujo de calcio, citocinas inflamatorias, anticuerpos e inmunotoxinas contra células tumorales y células tumorales necróticas, agentes quimioterapéuticos de la Tabla E o Tabla F, una combretastina, doxorubicina, etopósido y actinomomicina-D.

50 El docetaxel es un agente particularmente preferido para su uso en terapia de combinación. El docetaxel puede administrarse por separado en la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o conjugado de los mismos, bien antes o después. En cuanto a la administración simultánea, el docetaxel puede proporcionarse en formulaciones distintas o en las mismas formulaciones, opcionalmente dentro de un liposoma o liposoma furtivo, y preferentemente dentro del núcleo de un liposoma furtivo recubierto con una construcción, receptorcuerpo o

55 betacuerpo de la invención.

Tratamiento de Infecciones víricas: en otra realización general, la invención proporciona adicionalmente una nueva clase importante de composiciones y su uso en métodos para inhibir la replicación, infección y propagación de

virus para su uso en el tratamiento de infecciones víricas y enfermedades. Estos métodos se basan en el uso de una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, ya sea conjugado o no con un agente antivírico. Cabe destacar que, una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención ejercerá un efecto antivírico sin conexión a ningún agente adicional. Si se desea la conexión a agentes adicionales, los agentes citotóxicos y otros agentes serán eficaces en el tratamiento antivírico, así como agentes antivíricos clásicos. Dichas construcciones y conjugados son por tanto ampliamente aplicables en el tratamiento de una serie de infecciones víricas y enfermedades asociadas.

En un primer caso, los métodos antivíricos de la invención se refieren a poner en contacto una composición que comprende, o poblaciones de células o tejidos que contienen o que se sospecha que contienen, una célula infectada por virus, con una cantidad biológicamente eficaz de al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos. La célula infectada por virus es preferentemente una célula eucariota, tal como en la célula animal y preferentemente una célula de mamífero o de ser humano.

Los usos antivíricos pueden realizarse *in vitro* e *in vivo*. En las realizaciones *in vitro*, los métodos tienen importantes utilidades. Por ejemplo, en los programas de descubrimiento de fármacos para el desarrollo de fármacos antivíricos o combinaciones de los mismos, así como en la delineación de información adicional sobre infección, replicación y propagación de virus. También pueden usarse métodos antivíricos *in vitro* en la eliminación de virus de muestras biológicas, tales como poblaciones de células y cultivos de tejidos para su uso en laboratorio, de muestras, tejidos, semillas, partes de plantas y plantas para uso agrícola y de muestras de sangre y de tejidos para uso terapéutico.

En los métodos *in vivo*, cuando las células, poblaciones o tejidos se encuentran en un animal, la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos, se administra al animal como una terapia antivírica. Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos, puede unirse a la fosfatidilserina expuesta en la superficie de las células infectadas con virus, o puede unirse a la fosfatidilserina expuesta en la superficie de las partículas víricas.

En todos los casos, las composiciones, métodos y usos inhiben una o más etapas o fases necesarias para una infección vírica productiva o en curso, incluyendo la inhibición de la entrada de virus. Preferentemente, las composiciones, métodos y usos inhiben la replicación y/o propagación de virus, tal como inhibiendo una o más etapas de transcripción, traducción, ensamblaje, empaquetamiento y/o salida de virus en, o a partir de, una célula hospedadora infectada, tal como una célula de mamífero o de ser humano. La invención por lo tanto se limita preferentemente o se confina sustancialmente a infecciones víricas en células y poblaciones de células inicialmente infectadas, inhibiendo o impidiendo por tanto sustancialmente la infección posterior o en curso de células o tejidos hospedadores adicionales.

Los métodos de tratamiento antivíricos de la invención se refieren preferentemente a administrar, a un animal o a un paciente que tiene, o que se sospecha que tiene, o que tiene un riesgo a desarrollar, una infección vírica o enfermedad asociada, una cantidad biológicamente eficaz de al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos. Los conjugados pueden conectarse operativamente a inhibidores de ATPasa de tipo V, tales como salicililalamida, concanamicina o bafilomicina; a un inhibidor de la síntesis de proteínas, tal como psimberina, pederina, ircinostatina A; a una toxina de ricina, gelonina, abrina, difteria, pseudomonas o toserina; o a al menos un segundo agente antivírico distinto. Los agentes antivíricos adecuados para la conexión incluyen los expuestos en la Tabla G, tales como AZT o cidofovir.

Dado que la invención inhibe una o más etapas o fases necesarias para la infección productiva o en curso común a todos los virus, los métodos antivíricos y los usos de la invención, son adecuados para el tratamiento de todos los virus, tanto con envoltura como sin envoltura, incluyendo los que infectan plantas, animales, vertebrados, mamíferos y pacientes humanos. La invención es adecuada para el tratamiento de todos los virus que infectan vertebrados, como los enumerados en la Tabla H del presente documento, particularmente seres humanos, y particularmente virus que son patógenos en animales y en seres humanos. Las infecciones víricas y enfermedades asociadas y resultantes que la invención puede tratar incluyen los virus y las enfermedades que se exponen en la Tabla J, como se ilustra mediante el tratamiento de infecciones por CMV, RSV, arenavirus y VIH y las enfermedades hepatitis, gripe, neumonía, fiebre Lassa y SIDA. Se prefiere particularmente el tratamiento de virus con envoltura.

Los métodos de tratamiento antivíricos de la invención también pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Los métodos de tratamiento combinados comprenden administrar a un animal o a un paciente con una infección vírica una cantidad combinada, terapéuticamente eficaz, de al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos, y al menos un agente terapéutico o antivírico, segundo, distinto.

El al menos un agente antivírico "segundo, distinto" es en referencia a la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos, que es el "primer" agente antivírico. El al menos un segundo agente antivírico puede administrarse al animal o al paciente durante la administración de, o sustancialmente de manera simultánea con, el primer agente antivírico de la invención; o antes o después, es decir, secuencial a la administración del primer agente antivírico de la invención.

Cualquier agente terapéutico o agente antivírico puede usarse como el segundo agente terapéutico o antivírico en los métodos de tratamiento antivíricos combinados de la invención, incluyendo cualquiera de los agentes antivíricos descritos anteriormente en relación con los conjugados antivíricos, composiciones y kits de la invención.

5 Los métodos y usos de tratamiento antivíricos y para el cáncer anteriores a menudo implicarán la administración, por vía sistémica, de una composición farmacéuticamente eficaz al animal o paciente, tal como por inyección transdérmica, intramuscular, intravenosa y similar. Para el tratamiento de infecciones víricas, particularmente infecciones víricas respiratorias, la administración en el pulmón es otra realización preferida, y puede realizarse usando un aerosol. Sin embargo, se aceptará cualquier vía de administración que permita al agente terapéutico localizarse en el sitio del tumor o infección vírica. Por lo tanto, otras vías de liberación adecuadas incluyen la vía oral, 10 rectal, nasal, tópica y vaginal. Para los usos y métodos del tratamiento de la artritis, por ejemplo, puede emplearse la administración intrasnovial, como se describe para otros agentes inmunológicos en la Patente de Estados Unidos nº 5.753.230, específicamente incorporada en el presente documento por referencia. Para afecciones asociadas con los ojos, se contemplan las formulaciones oftálmicas y la administración oftálmica.

15 “Administración”, como se usa en el presente documento, significa suministrar o liberar una construcción receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos, en una o más cantidades y durante uno o más periodos de tiempo eficaces para ejercer un efecto terapéutico. La administración pasiva de los agentes terapéuticos proteicos es generalmente la preferida, en parte, por su sencillez y reproducibilidad.

20 Sin embargo, en el presente documento, el término “administración” se usa con referencia a cualquiera y a todos los medios mediante los cuales se libera el agente terapéutico. Por lo tanto, “administración” incluye el suministro de células que produce la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o conjugados de los mismos, de una manera eficaz. En dichas realizaciones, puede ser deseable formular o empaquetar las células en una membrana, estructura o dispositivo implantable, selectivamente permeable, en general uno que pueda retirarse al finalizar la terapia. La administración exógena seguirá siendo generalmente la preferida, ya que representa un método no invasivo que permite monitorizar y controlar muy de cerca la dosis.

25 Los métodos y usos terapéuticos de la invención también se amplían al suministro de ácidos nucleicos que codifican una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos, de una manera eficaz para dar como resultado la expresión *in vivo*. Cualquier terapia génica puede emplearse, tal como liberación de ADN desnudo, de genes y vectores recombinantes, la liberación basada en células, incluyendo la manipulación *ex vivo* de las células del paciente y terapias similares. Pueden usarse vectores de virus, tales como los incluidos en un retrovirus recombinante, virus del herpes simple (VHS), adenovirus, adenovirus asociados (AAV, *adeno-associated virus*), citomegalovirus (CMV) y similares. Los liposomas y los liposomas furtivos serán los preferidos para su uso en algunas realizaciones. 30

35 Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento de la invención emplean “cantidades terapéuticamente eficaces” de una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o conjugado de los mismos. Los “efectos terapéuticos” y las “cantidades terapéuticamente eficaces” consiguientes se miden mediante diferentes parámetros en el tratamiento contra el cáncer en comparación con el tratamiento antivírico.

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

45 En el tratamiento de infecciones víricas y enfermedades relacionadas, las cantidades de los agentes son eficaces para inhibir uno o más requisitos para la infección vírica en curso, tal como la entrada de virus, y preferentemente, la replicación, salida y propagación de virus de las células hospedadoras infectadas. Las cantidades también pueden destruir o eliminar al menos una parte de las células infectadas con virus de una manera que neutralice la replicación, propagación e infección vírica en curso. En conjunto, las cantidades de los agentes son eficaces para reducir, reducir significativamente o erradicar la infección vírica después de la administración a un animal o a un paciente. 50

55 Los términos “preferentemente” y “específicamente”, como se usan en el presente documento, significan que la construcción, el receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, o un conjugado de los mismos, consiguen efectos anticancerosos o antivíricos que están sustancialmente confinados al sitio de la enfermedad, y no causan sustancialmente coagulación, destrucción y/o necrosis de tejidos en tejidos normales, sanos del animal o sujeto. La estructura y función de las células y de los tejidos sanos se conservan por lo tanto sustancialmente inalteradas mediante la práctica de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede comprenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en esta memoria. El archivo de esta patente estadounidense contiene al menos un dibujo a color. Las copias de esta patente con uno más dibujos a color las proporcionará la oficina de patentes y marcas registradas tras efectuar su solicitud y pago de la tasa necesaria.

FIG. 1. Leucocitos se infiltran en el tumor en ratones tratados con el anticuerpo 3G4. Ratones desnudos portadores de tumores ortotópicos MDA-MB-231 se trataron 3 veces a la semana con 100 µg/dosis de anticuerpo 3G4 o con la misma dosis de un anticuerpo control del mismo isotipo. Al final del tratamiento, los animales se perfundieron y los tumores se congelaron al instante, se cortaron y se tiñeron para detectar los leucocitos. En la figura se muestra la infiltración de los leucocitos en el tumor.

FIG. 2A, FIG. 2B, FIG. 2C y FIG. 2D. Secuencias de ADN y de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *complementary determining regions*) del anticuerpo 3G4 y del anticuerpo 2aG4. Se presentan las secuencias de ADN y de aminoácidos de las cadenas pesada (FIG. 2A; SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2) y ligera (FIG. 2B; SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 4) del anticuerpo 3G4 y se muestran los sitios de restricción en las secuencias de ADN. La secuencia líder se diferencia de la proteína madura, que comienza como se muestra mediante la primera flecha en cada una de las FIG. 2A y FIG. 2B. Se exponen medios ejemplares de injerto de cada secuencia variable con una región constante humana, donde la que la primera parte de las secuencias respectivas de la región constante humana (SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8) se muestra mediante la segunda flecha en cada una de las FIG. 2A y FIG. 2B. Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de IgG2a y de la cadena ligera (C_K) de 3G4 se representan por SEC ID N°: 10 y SEC ID N°: 11, respectivamente, como se muestra en las FIG. 2C y FIG. 2D.

FIG. 3. Inhibición de la unión del anticuerpo 3G4 con PS inmovilizada usando liposomas fosfolípidicos competidores. Placas de microtitulación cubiertas con fosfolípidos se trataron con 3G4 a concentraciones que variaban de 0,016 a 33 nM en suero bovino al 10 %. El anticuerpo unido se detectó usando anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP. Los ensayos de competencia con liposomas preparados a partir de diversos fosfolípidos demuestran que los fosfolípidos aniónicos pueden competir con la unión de 3G4 (6,7 nM) a PS. Las barras representan la DT de mediciones por triplicado.

FIG. 4. Unión de 3G4 a fosfolípidos. Placas de microtitulación cubiertas con fosfolípidos se trataron con 3G4 a concentraciones que variaban de 0,016 a 33 nM en suero bovino al 10 %. El anticuerpo unido se detectó usando anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP. 3G4 se unió específicamente a fosfolípidos aniónicos incluyendo PS, PI, PA y CL, pero no a lípidos neutros, incluyendo PE, PC y SM.

FIG. 5A, FIG. 5B, FIG. 5C, FIG. 5D y FIG. 5E. Inducción de la unión de 3G4 a células HUVEC y MDA-MB-435 intactas mediante tratamiento con H₂O₂ como se muestra por FACS (FIG. 5A) e inmunohistoquímica (FIG. 5B, FIG. 5C, FIG. 5D y FIG. 5E). FIG. 5A, las células HUVEC o MDA-MB-435 se trataron con H₂O₂ (200 µM) durante 1 h a 37 °C. Las células se lavaron y se separaron de los discos de cultivo con tripsina. Las células se tiñeron con 3G4 (línea continua) o con IgG₃ de ratón control (BBG3) (línea discontinua) y se analizaron mediante citofluorometría usando FACS. El instrumento se seleccionó sobre células intactas (negativas a yoduro de propidio). FIG. 5A, parte superior izquierda, HUVEC; parte superior derecha, HUVEC tratadas con H₂O₂; parte inferior izquierda, MDA-MB-435; parte inferior derecha, MDA-MB-435 tratadas con H₂O₂. FIG. 5B, FIG. 5C, FIG. 5D y FIG. 5E, la morfología de la unión de 3G4 a HUVEC tratadas con H₂O₂ no permeabilizadas, intactas, se determinó tratando células adherentes con H₂O₂ como anteriormente, lavando las células y tiñéndolas con 3G4 o con IgG₃ de ratón control, BBG3, seguido de anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra marcado con FITC (verde). Después, las células se fijaron con paraformaldehído y se permeabilizaron. El citoesqueleto se tiñó con faloidina marcada con rojo Texas (rojo) y los núcleos se tiñeron con tinción de contraste DAPI (azul). 3G4 se unió a regiones distintas de la membrana plasmática, que tenía el aspecto de ampollas membranosas. FIG. 5B, HUVEC teñidas con BBG3; FIG. 5C, HUVEC teñidas con 3G4; FIG. 5D, células MDA-MB-435 teñidas con BBG3; y FIG. 5E, células MDA-MB-435 teñidas con 3G4. Las células que no se trataron con H₂O₂ no se tiñeron con 3G4. La barra de escala representa 50 µm.

FIG. 6A, FIG. 6B, FIG. 6C y FIG. 6D. Los anticuerpos contra fosfatidilserina y fosfolípidos aniónicos hacen que los monocitos se unan a vasos sanguíneos tumorales y que los macrófagos se infiltren en tumores. Ratones SCID portadores de tumores mamarios humanos ortotópicos se trataron i.p. con 100 µg de anticuerpos control BBG3 (FIG. 6A y FIG. 6C) o con anticuerpos 3G4 (FIG. 6B y FIG. 6D) tres veces a la semana durante dos semanas. Los tumores eran MDA-MB-435 (FIG. 6A y FIG. 6B) o MDA-MB-231 (FIG. 6C y FIG. 6D). Se prepararon secciones tumorales congeladas. Se detectaron macrófagos y monocitos de ratón con anticuerpo anti M1/70 de ratón (Mac-1) de rata seguido de anti-IgG de rata marcado con FITC (verde). Los anticuerpos anti-F4/80 y anti-Fcγr dieron patrones de tinción coincidentes con anticuerpo anti M1/70. Se detectaron vasos sanguíneos con anti CD31 de ratón de hámster seguido de anti-IgG de hámster marcado con rojo Texas (rojo). Los núcleos se visualizaron con DAPI (azul). FIG. 6A, tumor de ratón tratado con BBG3 control mostrando escasa infiltración de macrófagos. FIG. 6B, tumor de ratón tratado con 3G4 mostrando abundante infiltración de macrófagos. FIG. 6C, tumor control de ratón tratado con BBG3

mostrando la ausencia de conexión de monocitos a vasos. FIG. 6D, tumor de ratón tratado con 3G4 mostrando la conexión de monocitos a la superficie luminal del endotelio vascular tumoral (flechas). Las barras de escala en la FIG. 6A y FIG. 6B representan 50 μm y en la FIG. 6C y FIG. 6D representan 10 μm .

5 FIG. 7. Fases silenciosa e inflamatoria de la fagocitosis. A partir de estudios de tratamiento de tumores usando el anticuerpo 3G4, se propone que los anticuerpos, tales como 3G4, producen un bloqueo de la señalización de PS a partir de células endoteliales tumorales que expresan PS. Normalmente, la PS en las células endoteliales tumorales suprimirían las respuestas inflamatorias por macrófagos que se unen a los vasos y a las células tumorales (fase silenciosa). Cuando están presentes anticuerpos, tales como 3G4, estos se unen a PS de tal manera que el receptor de PS en el macrófago no tiene un compañero de unión. Después, el macrófago secreta TNF- α , IL-1 y otras
10 citocinas inflamatorias que dañan directamente el endotelio tumoral y reclutan células hospedadoras adicionales en el tumor (fase inflamatoria).

FIG. 8. El fragmento F(ab')₂ del anticuerpo 3G4 es tan eficaz como 3G4 como un agente antitumoral. Los ratones se inocularon con tumores el día 1, y el día 9 se trataron con el anticuerpo 3G4, con el fragmento F(ab')₂ del anticuerpo 3G4 o con un anticuerpo control del mismo isotipo (BBG3). Los tumores en los animales de control continuaron creciendo rápidamente (■), mientras que en los ratones tratados con cualquiera de anticuerpo 3G4 (●) o con el
15 fragmento F(ab')₂ del anticuerpo 3G4 (▼), el crecimiento del tumor se redujo significativamente, siendo el fragmento F(ab')₂ al menos tan eficaz como 3G4.

FIG. 9A y FIG. 9B. La unión de 3G4 a placas de microtitulación cubiertas con PS es dependiente de suero. FIG. 9A, el anticuerpo 3G4 se purificó de células que creían en medios que contenían suero (SCM, *serum containing media*)
20 bovino o medios aséricos (SFM, *serum-free media*). Una placa de microtitulación se cubrió con PS y se bloqueó en OVA al 1 %. Se realizaron diluciones en serie de 3G4 en suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*) al 10 % o en ovoalbúmina de clara de huevo de pollo (OVA) al 1 %. FIG. 9A, la placa de microtitulación se cubrió con PS y se bloqueó en OVA al 1 %. Se realizaron diluciones en serie de SFM 3G4 en suero al 10 % de las especies de ratón, rata, ser humano y bovino, como se indica.

FIG. 10A y FIG. 10B. 3G4 se une a la proteína plasmática β 2GPI (FIG. 10A) y se une al dominio II de β 2GPI (FIG. 10B). FIG. 10A, una placa de microtitulación se cubrió con β 2GPI humana (h β 2GPI) purificada de plasma humano y se bloqueó en OVA al 1 %. Se realizaron diluciones en serie de un anti β 2GPI humano de ratón comercial (anti β 2GPI o "α- β 2GPI"), de SFM 3G4, y de una IgG de ratón (mIgG) de control en OVA al 1 %. FIG. 10B, los pocillos de una placa de microtitulación se cubrieron con los péptidos h β 2GPI de longitud completa (dominio I-V) recombinante o h β 2GPI sin dominio I (II-V), sin dominios I y II (III-V), sin dominios I-III (IV-V) o sin dominios I-IV (V). La placa se
25 bloqueó en OVA al 1 % y se realizaron diluciones en serie de SFM 3G4 en OVA al 1 %.

FIG. 11. ch3G4 y β 2GPI deben estar presentes simultáneamente para unirse a células endoteliales (CE) con PS expuesta. Se incubaron células ABAE durante 30 minutos con lisofosfatidilcolina (LPC) 200 μM en DMEM + suero de ratón (MS, *mouse serum*) normal al 10 %, más (i) h β 2GPI purificada, (ii) ch3G4 o (iii) ch3G4 + h β 2GPI
35 simultáneamente. Después, las células se lavaron y se incubaron durante 30 minutos con (i) ch3G4, (ii) h β 2GPI, o (iii) DMEM + MS al 10 %, respectivamente. Finalmente, las células se lavaron, se fijaron y se tiñeron con marcadores fluorescentes para detectar la unión de ch3G4. ch3G4 y h β 2GPI se usaron a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El área píxel de la unión de ch3G4 se cuantificó usando el programa informático MetaVue. Los valores son relativos a la unión de ch3G4 en la condición (i), que se estableció como uno.

FIG. 12A y FIG. 12B. La región de unión a lípidos de β 2GPI es necesaria para mediar en la unión de ch3G4 con células endoteliales con PS expuesta. FIG. 12A, se incubaron células ABAE con ch3G4 más (i) una forma de unión no lipídica de β 2GPI (h β 2GPI con muesca) o (ii) h β 2GPI intacta. Las incubaciones se realizaron en presencia o en ausencia de LPC 200 μm en DMEM + MS al 10 % durante 30 minutos. Después, las células se lavaron, se fijaron y se tiñeron con marcadores fluorescentes para detectar la unión de ch3G4. Se usó ch3G4, h β 2GPI y h β 2GPI con
45 muesca a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El área píxel de la unión de ch3G4 se cuantificó usando el programa informático MetaVue. Los valores son relativos a la unión de ch3G4 en la condición (i) sin LPC, que estableció como uno. Fig. 12B, los pocillos de una placa de microtitulación se cubrieron con h β 2GPI o con h β 2GPI con muesca y se bloquearon en OVA al 1 %. Se realizaron diluciones en serie de ch3G4 o de mIgG control en OVA al 1 %.

FIG. 13. El exceso de ch3G4 inhibe la unión de complejos ch3G4/ β 2GPI con células endoteliales con PS expuesta. Se incubaron células ABAE durante 30 minutos con LPC 200 μM , con h β 2GPI purificada 40 nm y con un título de ch3G4 en DMEM + MS al 10 %. Después, las células se lavaron, se fijaron y se tiñeron con marcadores fluorescentes para detectar la unión de ch3G4. El área píxel de la unión de ch3G4 se cuantificó usando el programa informativo MetaVue. Los valores son relativos a la unión de ch3G4 320 μM , que se estableció como uno.

FIG. 14A, FIG. 14B y FIG. 14C. La divalencia de ch3G4 es necesaria para mediar en la unión de β 2GPI con células endoteliales con PS expuesta. FIG. 14A, se incubaron células ABAE durante 30 minutos con 3G4, F(ab')₂ de 3G4 o monómero Fab' de 3G4 20 nM en presencia o en ausencia de LPC 200 μM en DMEM + FBS al 10 %. Después las células se lavaron, se fijaron y se tiñeron con marcadores fluorescentes para detectar la unión de 3G4 o de los fragmentos de 3G4. El área píxel de la unión del anticuerpo se cuantificó usando el programa informático MetaVue. Los valores son relativos a la unión de 3G4 en ausencia de LPC, que estableció como uno. FIG. 14B, células ABAE

- se incubaron durante 30 minutos con LPC 200 μ M, h β 2GPI purificada 40 nM y un título de monómero Fab' de 3G4 en DMEM + MS al 10 %. Después, las células se lavaron, se fijaron y se tiñeron con marcadores fluorescentes para detectar la unión de Fab' de 3G4. El área pixel de la unión de Fab' de 3G4 se cuantificó usando el programa informático MetaVue. Los valores son relativos a la unión de Fab' de 3G4 2 nM, que se estableció como uno. FIG. 14C, células ABAE se incubaron durante 30 minutos con LPC 200 μ M, h β 2GPI purificada 40 nM, ch3G4 20 nM y un título de monómero Fab' de 3G4 en DMEM + MS al 10 %. Después, las células se lavaron, se fijaron y se tiñeron con marcadores fluorescentes para detectar la unión de ch3G4. El área pixel de la unión de ch3G4 se cuantificó usando el programa informático MetaVue. Los valores son relativos a la unión de ch3G4 sin competidor Fab' 3G4, que se estableció como 100.
- FIG. 15. Representación esquemática de la unión dependiente de β 2GPI del anticuerpo 3G4 y del anticuerpo quimérico de ser humano-ratón compañero, denominado "bavituximab", a una superficie con PS, β 2GPI se muestra con sus cinco dominios (I, II, III, IV y V). La unión del anticuerpo a superficies con PS, incluyendo PS expuesta en membranas celulares, está mediada por la unión al dominio II de β 2GPI.
- FIG. 16. Representación esquemática de una construcción Fc- β 2GPI ejemplar. En esta construcción, las regiones variables de un anticuerpo se han retirado, pero no se han reemplazado por β 2GPI. En su lugar, β 2GPI está conectada al extremo C de los dominios C_{H3} de la región Fc. La figura muestra la región bisagra unida por puentes disulfuro, los dos dominios C_{H2} y C_{H3} de la región Fc de IgG_{2a} de ratón están conectados operativamente a dos proteínas β 2GPI de ratón. En la construcción humana homóloga, la región Fc de la IgG₁ humana estaría conectada operativamente a dos proteínas β 2GPI humanas. La región Fc de la IgG₃ humana también se preferiría para su uso con dos proteínas β 2GPI humanas. En la construcción Fc- β 2GPI ejemplar representada, se muestra la β 2GPI de ratón con los cinco dominios (I-V), aunque podrían prepararse fácilmente otras construcciones de ratón o de ser humano sin los cinco dominios, siempre que se conserve la región de unión a lípidos del dominio V de β 2GPI.
- FIG. 17. Mapa del plásmido de la construcción Fc-m β 2GPI. La primera construcción Fc- β 2GPI preparada, denominada "Fc-m β 2GPI", se generó a partir de tres unidades: (1) la secuencia de señal de la cadena ligera de 3G4 amplificada por PCR a partir de la construcción 2aG4; (2) una región Fc de IgG_{2a} de ratón que contiene la bisagra, C_{H2}, C_{H3}, amplificada por PCR a partir de la construcción 2aG4; y (3) β 2GPI de ratón amplificada por RT-PCR a partir de ARN de hígado de ratón obtenido en el comercio. Se muestra el mapa del plásmido. La secuencia del plásmido se proporciona como SEC ID N°: 25.
- FIG. 18A. Secuencia de aminoácidos de Fc-m β 2GPI. El péptido señal ("sec señal mIgGk") MDMRAPAQILGFLLLLFPGRCLR, que está escindido, se representa por SEC ID N°: 18. La posición 1 indica el inicio de la proteína Fc-m β 2GPI madura después de que el péptido señal se haya escindido. La secuencia de aminoácidos de la proteína Fc-m β 2GPI madura es la SEC ID N°: 19. Se indican, la bisagra, los dominios C_{H2} y C_{H3} de la región Fc, así como los dominios I, II, III, IV y V de la β 2GPI de ratón. Los restos de Cys implicados en la formación de enlaces disulfuro intradominio en β 2GPI se muestran en **negrita y sombreado**. Los aminoácidos en *cursiva subrayados* forman parte de la región cargada positivamente implicados en el reconocimiento de fosfolípidos aniónicos. Los aminoácidos *en cursiva con doble subrayado* forman parte del bucle hidrófobo necesario para la unión a las membranas lipídicas. La secuencia de aminoácidos comienza con los que están implicados en el reconocimiento de fosfolípidos aniónicos y termina con los que forman parte del bucle hidrófobo necesario para la unión a las membranas lipídicas, KNKEKXCSYVEAHCRDGTIEIPSCFKEHSSLAFWK, es la SEC ID N°: 20.
- FIG. 18B. Secuencias de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada humana y de β 2GPI humana para preparar Fc- β 2GPI (Fc-h β 2GPI) humano. La región constante de la cadena pesada de la IgG₁ humana (número de registro P01857; SEC ID N°: 21) se presenta comenzando con el dominio C_{H1}, que puede estar deletado. En el Fc-h β 2GPI humano, la bisagra (el inicio de la bisagra coincide con la posición 1 en la FIG. 18A), los dominios C_{H2} y C_{H3} humanos vienen seguidos de la β 2GPI humana (número de registro 1C1ZA; SEC ID N°: 22), que se muestra que incluye los dominios I, II, III, IV y V. La secuencia de aminoácidos de un Fc-h β 2GPI es la SEC ID N°: 23. La estructura del dominio de la β 2GPI humana coincide estrechamente con la de la β 2GPI de ratón (FIG. 18A), incluyendo la localización de los restos de Cys implicados en la formación de enlaces disulfuro intradominio (**en negrita y sombreado**), los aminoácidos que forman parte de la región cargada positivamente implicados en el reconocimiento de fosfolípidos aniónicos (*en cursiva subrayado*) y los aminoácidos que forman parte del bucle hidrófobo necesario para la unión a las membranas lipídicas (*en cursiva con doble subrayado*). La secuencia de aminoácidos comienza con los que están implicados en el reconocimiento de fosfolípidos aniónicos y termina con los que forman parte del bucle hidrófobo necesario para la unión a las membranas lipídicas, KNKEKKCSYTEDAQCIDGTffivPKCFBCEHSSLAFWK, es la SEC ID N°: 24.
- FIG. 19. Expresión de Fc-m β 2GPI y captura por el anti-IgG de ratón. La construcción Fc-m β 2GPI se transfectó en células CHO con el reactivo FuGENE 6. Dos días después, el sobrenadante celular se recogió y se sometió a ensayo. En el ensayo de expresión, una placa de microtitulación se cubrió con anti-IgG de ratón y se bloqueó con OVA al 1 %. Se realizaron diluciones en serie de los sobrenadantes del cultivo celular en OVA al 1 %. Los clones n° 8 y n° 18 son dos clones diferentes de Fc-m β 2GPI. La unión se detectó con ch3G4 y anti-IgG humano conjugado con HRP. El vector es el control negativo, que es la línea base.
- FIG. 20. Fc-m β 2GPI se une a PS en placas recubiertas con PS. En este ensayo de unión, una placa de

microtitulación se cubrió con PS y se bloqueó con OVA al 1 %. Se realizaron diluciones en serie de sobrenadantes de cultivo celular de Fc-m β 2GPI en OVA al 1 %. Los clones n $^{\circ}$ 8 y n $^{\circ}$ 18 son dos clones diferentes de Fc-m β 2GPI. La unión se detectó con anti-IgG de ratón conjugado con HRP.

5 FIG. 21. Fc-m β 2GPI se une a fosfolípidos aniónicos. Este ensayo mide la unión de Fc-m β 2GPI a fosfolípidos en FBS al 10 %. Las placas de microtitulación se cubrieron con diversos fosfolípidos, como se indicó, y se bloquearon con OVA al 1 %. Se realizaron diluciones en serie del sobrenadante de cultivo celular de Fc-m β 2GPI en OVA al 1 %. La unión se detectó con anti-IgG de ratón conjugado con HRP. Fc-m β 2GPI se une a los fosfolípidos aniónicos PS, PA, PI y PG, pero no a los lípidos neutros, PC y SM.

10 FIG. 22A, FIG. 22B y FIG. 22C. Fc-m β 2GPI detecta PS expuesta en células ABAE naturalmente apoptóticas. Se sembraron 2x10 4 células ABAE en portaobjetos con cámaras de vidrio de 8 pocillos en DMEM + FBS al 10 % durante una noche a 37 °C. Al día siguiente, las células se lavaron y se incubaron con 2aG4 (FIG. 22A), con sobrenadante de células CHO transfectadas con Fc-m β 2GPI (FIG. 22B) o con células transfectadas de manera simulada ("sobrenadante control", FIG. 22C). 2aG4 y Fc-m β 2GPI se detectaron con un anticuerpo secundario marcado con FITC (verde). Los citoesqueletos y los núcleos se tiñeron con tinción de contraste con faloidina marcada con rojo Texas (rojo) y con DAPI (azul), respectivamente. Las flechas ponen en relieve las células apoptóticas.

15 FIG. 23A y FIG. 23B. Fc-m β 2GPI detecta PS expuesta en células ABAE tratadas con LPC. Se sembraron 2x10 4 células ABAE en portaobjetos con cámaras de vidrio de 8 pocillos en DMEM + FBS al 10 % durante una noche a 37 °C. Al día siguiente, las células se lavaron y se incubaron con sobrenadante de células CHO transfectadas con Fc-m β 2GPI. El Fc-m β 2GPI se detectó con un anticuerpo secundario marcado con FITC (verde). Los citoesqueletos y los núcleos se tiñeron con tinción de contraste con faloidina marcada con rojo Texas (rojo) y con DAPI (azul), respectivamente. Cada una de la FIG. 23A y FIG. 23B representa la unión de Fc-m β 2GPI, que se observa como pequeñas puntas de alfiler de color gris.

20 FIG. 24A, FIG. 24B, FIG. 24C y FIG. 24D. Una construcción β 2GPI dimérica artificial se une a células endoteliales con PS expuesta. Células ABAE se incubaron durante 30 minutos con LPC 200 μ M en DMEM + FBS al 10 % más monómero de h β 2GPI purificado (FIG. 24A), dímero de h β 2GPI-dímero (FIG. 24B) o un dímero de h β 2GPI mutante que puede unirse a lípidos (FIG. 24C). Después las células se lavaron y se incubaron con anti- β 2GPI para detectar monómeros y dímeros de h β 2GPI. El anticuerpo anti- β 2GPI no reconoce la β 2GPI de bovino; por lo tanto, la presencia de FBS al 10 % no inhibió la detección de monómeros de h β 2GPI o dímeros de h β 2GPI. Después, las células se lavaron, se fijaron y se tiñeron con marcadores fluorescentes. El citoesqueleto aparece en color rojo, los núcleos en color azul y los monómeros de h β 2GPI y dímeros de h β 2GPI aparecen en color verde. FIG. 24D, el área de unión de los monómeros de h β 2GPI y dímeros de h β 2GPI se cuantificó usando el programa informático MetaVue. Todos los valores son relativos a la unión de los dímeros de h β 2GPI con células no tratadas con LPC, que se estableció como uno.

35 Descripción de realizaciones ilustrativas

Los tumores sólidos y los carcinomas representan más del 90 % de todos los cánceres en el ser humano. Aunque el uso de anticuerpos monoclonales e inmunotoxinas se ha investigado en la terapia de linfomas y leucemias (Vitetta *et al.*, 1991), estos agentes han decepcionado al ser ineficaces en ensayos clínicos contra carcinomas y otros tumores sólidos (Abrams y Oldham, 1985). Una razón principal de la ineficacia de los tratamientos basados en anticuerpos es que las macromoléculas no se transportan fácilmente en los tumores sólidos. Incluso una vez dentro de una masa tumoral, estas moléculas no se distribuyen homogéneamente debido a la presencia de estrechas uniones entre las células tumorales, el estroma fibroso, los gradientes de presión intersticial y barreras de sitios de unión (Denekamp, 1990; Dvorak *et al.*, 1991).

45 En el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de tumores sólidos, los métodos que implican la actuación sobre el sistema vascular del tumor, en lugar de sobre las células tumorales, ofrecen distintas ventajas. Una destrucción o bloqueo eficaz de los vasos tumorales detiene el flujo sanguíneo través del tumor, dando como resultado una avalancha de celulares tumorales muertas. Las construcciones de anticuerpo-toxina y de anticuerpo-coagulante, ejemplos de agentes que actúan sobre el sistema vascular (VTA, *vascular targeting agents*) que destruyen y/u obstruyen selectivamente vasos sanguíneos tumorales, ya se han usado con un gran efecto sobre el direccionamiento y la destrucción específicos del sistema vascular tumoral, dando como resultado la necrosis tumoral (Burrows *et al.*, 1992; Burrows y Thorpe, 1993; documentos WO93/17715; WO96/01653; Huang *et al.*, 1997).

50 Los VTA ejercen su acción primaria en los vasos sanguíneos preexistentes de tumores sólidos y se diferencian de los agentes antiangiogénicos en que impiden la formación de nuevos vasos sanguíneos. Existen diversas ventajas de los VTA sobre otras terapias contra el cáncer. En primer lugar, un solo vaso proporciona la nutrición, y facilita la retirada de productos residuales del metabolismo de cientos o miles de células tumorales, y si se daña en un solo punto bloquea el flujo sanguíneo aguas arriba o aguas abajo. Los VTA son por tanto particularmente eficaces sobre los tumores establecidos. En segundo lugar, la destrucción de las células endoteliales, aunque es un mecanismo útil, no se requiere. Un cambio de forma o inicio local de la coagulación sanguínea puede ser suficiente. En tercer lugar,

las células endoteliales son adyacentes a la corriente sanguínea, garantizando una distribución adecuada del fármaco. En cuarto lugar, la diana es una célula diploide normal que es poco probable que adquiera mutaciones genéticas que la hacen resistente a fármacos. En quinto lugar, puede medirse un marcador sustituto de actividad biológica, es decir, el flujo sanguíneo.

5 En sexto lugar, efectos temporales sobre la función vascular pueden ser suficientes para los efectos antitumorales significativos. Estudios realizados indican que más del 99 % de las células tumorales *in vivo* pueden destruirse durante un periodo de isquemia de 2 horas. Finalmente, a diferencia de los inhibidores de la angiogénesis, los VTA solo requieren administración intermitente para actuar en sinergia con tratamientos convencionales, en lugar de administración prolongada durante meses o años.

10 Los VTA citotóxicos se describen en las siguientes patentes: Patentes de Estados Unidos nº 5.660.827, 5.776.427, 5.855.866, 5.863.538, 5.965.132, 6.004.554, 6.051.230, 6.261.535 y 6.451.312. Cuando los anticuerpos, factores de crecimiento u otros ligandos de unión se usan para suministrar específicamente un coagulante en el sistema vascular tumoral, dichos agentes se denominan "coagulandos". Los VTA coagulandos se describen en las siguientes patentes: Patentes de Estados Unidos nº 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289 y 6.036.955.

15 Un coagulante actualmente preferido para su uso en coagulandos es el factor tisular truncado (Tft, *truncated Tissue Factor*) (Huang *et al*, 1997; documento WO 96/01653; Patente de Estados Unidos 5.877.289). El TF es el principal iniciador de la coagulación sanguínea (Ruf *et al*, 1991; Edgington *et al*, 1991). En los sitios de lesión, el Factor VII/VIIa presente en la sangre se pone en contacto con, y se une al, TF en células en los tejidos perivasculares. El complejo TF:VIIa, en presencia de fosfolípidos en superficie, activa los factores IX y X. Esto
20 conduce, a su vez, a la formación de trombina y fibrina y, finalmente, a un coágulo sanguíneo (Ruf y Edgington, 1994).

La forma recombinante del factor tisular truncado (tFT), que carece de los dominios citosólicos y transmembrana, es una proteína soluble que tiene aproximadamente cinco órdenes de magnitud más bajos de capacidad de inducción de coagulación en comparación con la forma nativa del TF (Stone *et al*, 1995; Huang *et al*, 1997). Esto se debe a
25 que el TF necesita estar asociado con fosfolípidos para que el complejo con VIIa active IXa o Xa de manera eficaz. Sin embargo, cuando se libera tFT al endotelio vascular tumoral por medio de un anticuerpo o agente diana, este se vuelve a poner en contacto en proximidad con una superficie lipídica y recupera actividad trombogénica (Huang *et al*, 1997; Patentes de Estados Unidos nº 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289 y 6.036.955). Por tanto, se crea un coagulando que, de manera selectiva, produce trombosis del sistema vascular tumoral.

30 El TF truncado tiene diversas ventajas que recomiendan su uso en coagulandos diana vasculares: el tFT humano puede obtenerse fácilmente, y la proteína humana tendrá una inmunogenicidad baja o insignificativa en el ser humano; el tFT es completamente funcional en animales de laboratorio, incluyendo ratones; y el tFT diana es muy fuerte ya que desencadena la activación de una cascada de proteínas de coagulación, proporcionando un efecto enormemente amplificado (Patentes de Estados Unidos nº 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289 y 6.036.955).

35 Se han descrito diversas moléculas diana adecuadas que se encuentran en el endotelio tumoral, pero que, en gran medida, no encuentran en el endotelio normal. Por ejemplo, pueden utilizarse dianas expresadas, tales como endogлина, E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1, PSMA, un TIE, un ligando reactivo con LAM-1, un receptor de VEGF/VPF, un receptor de FGF, $\alpha_3\beta_3$ integrina, pleiotropina o endosialina (Patentes de Estados Unidos 5.855.866 5.877.289; Burrows *et al*, 1992; Burrows y Thorpe, 1993; Huang *et al*, 1997; Liu *et al*, 1997; Ohizumi *et al*, 1997; cada una de ellas incorporada en el presente documento por referencia).
40

Las dianas absorbidas, tales como VEGF, FGF, TGF β , HGF, PF4, PDGF, TIMP, un ligando que se une a TIE o una isoforma de fibronectina asociada a tumor (Patentes de Estados Unidos nº 5.877.289, 5.965.132, 6.051.230 y 6.004.555) son otro grupo adecuado. Las isoformas de fibronectina son ligandos que se unen a la familia de receptores de integrina. Las isoformas de fibronectina asociadas a tumor son componentes que pueden actuar tanto
45 sobre el sistema vascular tumoral como sobre el estroma tumoral. El anticuerpo monoclonal BC-1 (Carnemolla *et al*, 1989) se une específicamente a isoformas de fibronectina asociadas a tumor.

Otras dianas inducibles por el entorno tumoral natural o después de la intervención humana, también son entidades direccionables, como se describe en las Patentes de Estados Unidos nº 5.776.427, 5.863.538 y 6.036.955. Cuando se usan junto con supresión previa en inducción vascular tumoral y en tejidos normales, los antígenos del MHC de Clase II también pueden emplearse como dianas (Patentes de Estados Unidos nº 5.776.427, 5.863.538, 6.004.554 y 6.036.955).
50

Una diana actualmente preferida en aplicaciones clínicas es la molécula 1 de adhesión endotelial vascular (VCAM-1) (Patentes de Estados Unidos nº 5.855.866, 5.877.289, 6.051.230, 6.004.555 y 6.093.399). La molécula VCAM-1 es una molécula de adhesión celular que está inducida por las citocinas inflamatorias IL-1 α , IL-4 (Thornhill *et al*, 1990) y TNF α (Munro, 1993) y cuya función *in vivo* es reclutar leucocitos en sitios de inflamación aguda (Bevilacqua, 1993).
55

VCAM-1 está presente en células endoteliales vasculares en diversos tumores malignos humanos incluyendo neuroblastoma (Patey *et al*, 1996), carcinoma renal (Droz *et al*, 1994), carcinoma pulmonar no microcítico (Staal-van den Brekel *et al*, 1996), enfermedad de Hodgkin (Patey *et al*, 1996) y angiosarcoma (Kuzu *et al*, 1993), así como en

tumores benignos, tales como angioma (Patey *et al.*, 1996) y hemangioma (Kuzu *et al.*, 1993). La expresión constitutiva de VCAM-1 en el ser humano está confinada en algunos vasos en el tiroides, timo y riñón (Kuzu *et al.*, 1993; Bruijn y Dinklo, 1993), y en el ratón en vasos en el corazón y pulmón (Fries *et al.*, 1993).

5 Algunos de los datos presentados en este documento incluso complementan adicionalmente los proporcionados en las Patentes de Estados Unidos n° 5.855.866, 5.877.289, 6.051.230, 6.004.555 y 6.093.399 y muestran la inducción selectiva de trombosis e infarto tumoral dando como resultado la administración de un coaguligando anti VCAM-1•tFT. Los resultados presentados se generaron usando ratones portadores de linfoma de Hodgkin humano L540. Cuando este tumor se desarrolla como un xenoinjerto en ratones SCID, muestra una estrecha similitud con la enfermedad humana con respecto a la expresión de citocinas inflamatorias (Diehl *et al.*, 1985) y a la presencia de VCAM-1 y otras moléculas de activación de células endoteliales en su sistema vascular.

10 En el presente documento se muestra que, usando un coaguligando anti-VCAM-1•tFT ligado por enlace covalente, en el que el tFT se ligó directamente al anticuerpo anti-VCAM-1, el coaguligando se localiza selectivamente en vasos tumorales, induce la trombosis de estos vasos, produce necrosis que se desarrolla en todo el tumor y retrasa el crecimiento tumoral en ratones portadores de tumores de Hodgkin L540 sólidos. Generalmente se precisa que los tumores tengan un diámetro de al menos aproximadamente 0,3 cm para responder al coaguligando, debido a que VCAM-1 no está presente en tumores más pequeños. Supuestamente, en tumores pequeños, los niveles de citocinas secretadas por las células tumorales o por las células hospedadoras que infiltran el tumor son demasiado bajos para la inducción de VCAM-1. Esto coincide con los estudios de las Patentes de Estados Unidos n° 5.855.866, 5.877.289, 6.051.230, 6.004.555 y 6.093.399, en los que las invenciones demostraron que eran más útiles en tumores sólidos más grandes.

15 Aunque la tinción de VCAM-1 se observó inicialmente más en la periferia del tumor, el coaguligando se unió manifiestamente a, y obstruyó, vasos transportadores de sangre, por lo que pudo reducir el flujo sanguíneo en todas las regiones tumorales. Además, uno de los inventores contempla que la generación de trombina producida por la administración inicial del coaguligando probablemente conduce a inducción de VCAM-1 adicional sobre los vasos centrales (Sluiter *et al.*, 1993), dando como resultado una señal amplificada y una destrucción evidente de la región intratumoral. Este tipo de expresión inducida por coaguligando de marcadores direccionables adicionales, y por tanto amplificación de señal, también se desvela en la Patente de Estados Unidos n° 6.036.955.

20 Como se muestra en el presente documento, aunque la localización en vasos que expresan VCAM-1 en el corazón y en los pulmones de ratones se observó después de la administración de un coaguligando anti-VCAM-1, esta construcción no indujo la trombosis en dichos sitios no tumorales. Además, el coaguligando anti-VCAM-1 no era más tóxico en ratones de lo que lo era un coaguligando de control de especificidad irrelevante, indicando de nuevo que la expresión constitutiva de VCAM-1 en los vasos del corazón y pulmones no conducía a toxicidad. Estos datos son importantes para el progreso clínico inmediato de la terapia con coaguligandos, dado que VCAM-1 es un marcador de origen natural de endotelio vascular tumoral en seres humanos. Sin embargo, este fenómeno también proporciona a los inventores una perspectiva exclusiva, que conduce a una estrategia diferente para la destrucción del sistema vascular tumoral.

A. Descubrimiento de anticuerpos anti fosfatidilserina desnudos para el tratamiento tumoral

25 Los inventores buscaban entender el mecanismo sobre la capacidad del coaguligando anti VCAM-1 para unirse a la molécula VCAM-1 expresada de manera constitutiva en vasos sanguíneos en el corazón y en los pulmones, y a pesar de eso, no producir trombosis en esos vasos. Existen diversas posibilidades científicas para esta observación empírica, generalmente relacionadas con la naturaleza protrombótica del entorno tumoral y con cualquier predisposición fibrinolítica en el corazón y en los pulmones.

30 Generalmente, hay un equilibrio biológico entre el sistema de coagulación (depósito de fibrina) y el sistema fibrinolítico (degradación de fibrinas por enzimas). Sin embargo, en enfermedades malignas, particularmente carcinomas, este equilibrio se altera, dando como resultado una activación de coagulación anómala (hipercoagulabilidad o "estado protrombótico"). A pesar de realizar una exhaustiva investigación, hasta hace poco no ha podido discernirse una explicación molecular clara de la naturaleza protrombótica del entorno tumoral.

35 Después de efectuar análisis detallados de muchas posibles opciones, los inventores pensaron que el hecho de que el coaguligando anti-VCAM-1 no pudiese ocasionar trombosis en vasos de tejidos normales se debía a la ausencia de fosfatidilserina en la superficie luminal de dichos vasos. Por tanto, para completar la teoría, no solo debería mostrarse la ausencia de fosfatidilserina en estos vasos normales, sino que su presencia en el lado luminal de los vasos asociados a tumores tendría que demostrarse.

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

La ausencia de efecto trombótico del coagulando anti-VCAM-1 en vasos normales del corazón y pulmón se explicó de este modo, al menos en parte: la ausencia de fosfatidilserina, significa que los vasos normales carecen de una superficie procoagulante sobre la cual pueden ensamblarse los complejos de coagulación. En ausencia de PS en la superficie, el anti-VCAM-1• tFT se une a vasos del corazón y pulmones que expresan VCAM-1, pero no pueden inducir la trombosis. En cambio, los vasos que expresan VCAM-1 en el tumor muestran expresión coincidente de PS en la superficie. Por tanto el coagulando se une a vasos tumorales y activa los factores de coagulación localmente para formar trombos oclusivos.

Además de delinear los efectos trombóticos específicos de tumor de los coagulandos anti-VCAM-1, la expresión específica de la fosfatidilserina en la superficie luminal de vasos sanguíneos tumorales también permitió a los inventores explicar el fenotipo protrombótico observado, pero no entendido, en estudios anteriores. La expresión de PS desempeña una función significativa en el estado protrombótico del sistema vascular tumoral.

Después de este descubrimiento de que el aminofosfolípido representativo, la fosfatidilserina, se expresaba específicamente en la superficie luminal de los vasos sanguíneos tumorales, pero no en los vasos sanguíneos normales, los inventores pensaron que otros aminofosfolípidos tenían potencial como dianas para la intervención terapéutica. Por lo tanto los inventores desarrollaron métodos de direccionamiento y de tratamiento del sistema vascular tumoral basados en el direccionamiento de los aminofosfolípidos fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (PE).

Una vez demostrado el descubrimiento de la fosfatidilserina como un marcador específico del sistema vascular tumoral, los inventores comenzaron a desarrollar una serie de inmunotoxinas y coagulandos dirigidos por fosfatidilserina para su uso en el tratamiento de tumores. Como se explica en la Patente de Estados Unidos nº 6.406.693, aunque se investiga el potencial del direccionamiento de la fosfatidilserina en el contexto de suministrar una toxina o un coagulante en el sistema vascular tumoral, los inventores descubrieron de manera fortuita que los anticuerpos anti PS desnudos tenían un efecto destructor sobre el sistema vascular tumoral *in vivo* en ausencia de cualquier resto efector adicional. La capacidad de los anticuerpos anti aminofosfolípido para localizarse específicamente en el sistema vascular tumoral y ejercer un efecto destructor simultáneo, que conduce a necrosis tumoral, era sumamente inesperado.

Estos descubrimientos dieron lugar al tratamiento tumoral usando anticuerpos no conjugados o “desnudos” que se unen a fosfatidilserina, como se describe en la Patente de Estados Unidos nº 6.406.692. Aunque los efectos antitumorales en los modelos animales aceptados en la técnica se demostraron en la Patente de Estados Unidos nº 6.406.693, y se ampliaron en ese documento, la capacidad de los aminofosfolípidos para actuar como marcadores direccionables, inocuos y eficaces, del sistema vascular tumoral podría no haberse previsto en estudios previos a la Patente de Estados Unidos nº 6.406.693.

B. Tratamiento tumoral extensivo con anticuerpos anti fosfatidilserina

La fosfatidilserina normalmente se segrega en la superficie interna de la bicapa de la membrana plasmática en diferentes células (Gaffet *et al*, 1995; Julien *et al*, 1995) y esta segregación de lípidos crea una bicapa transitoria asimétrica (Williamson y Schlegel, 1994). Los inventores demostraron anteriormente que la PS se translocaba en la superficie de las células endoteliales vasculares tumorales y que esto ocurría, al menos en parte significa, independientemente de los mecanismos apoptóticos u otros mecanismos de muerte celular (Patente de Estados Unidos nº 6.406.693). Por tanto, la expresión de PS en la superficie en el entorno tumoral no es una consecuencia de muerte celular, ni tampoco desencadena una destrucción celular inmediata. A pesar de que la exposición de PS se detecta regularmente en células endoteliales vasculares intactas en diversos tumores sólidos, el endotelio vascular tumoral no es francamente apoptótico, sino que es morfológicamente sano (aunque diferente al de los tejidos normales) y metabólicamente activo. Esto es importante para los métodos terapéuticos basados en el direccionamiento de PS, lo que significa que la translocación de PS en la membrana externa en las células endoteliales vasculares tumorales es suficientemente estable para que la PS sirva como una entidad direccionable para el éxito de la terapia (usando anticuerpos desnudos o conjugados terapéuticos).

A través del desarrollo de herramientas biológicas con exquisita especificidad por diferentes fosfolípidos, los autores de la presente invención identificaron que los fosfolípidos aniónicos también se regulaban positivamente en células endoteliales vasculares tumorales. Por tanto, los fosfolípidos aniónicos son marcadores específicos y estables del sistema vascular tumoral, permitiendo la intervención terapéutica usando anticuerpos tanto desnudos como inmunoconjugados que se unen a fosfolípidos aniónicos.

Los fosfolípidos aniónicos están en gran medida ausentes de la superficie de células de mamífero en reposo en condiciones normales. La fosfatidilserina, que es el fosfolípido aniónico más abundante de la membrana plasmática, se segrega íntegramente en la cara interna de la membrana plasmática en la mayoría de los tipos de células en condiciones normales (Williamson y Schlegel, 1994; Zwaal y Schroit, 1997). El fosfatidilinositol (PI), otro fosfolípido aniónico principal, también está situado predominantemente en la cara interna de la membrana plasmática (Calderon y DeVries, 1997). Los fosfolípidos aniónicos minoritarios, el ácido fosfátidico (PA) y el fosfatidilglicerol (PG), solo se han observado en algunos tipos de células, pero también aparecen situados principalmente en la cara interna de la membrana plasmática (Hinkovska-Galcheva *et al*, 1989). La cardiolipina (CL), otro fosfolípido aniónico, está presente

en la membrana mitocondrial y ausente en la membrana plasmática (Daum, 1985).

Los fosfolípidos neutros también se distribuyen asimétricamente en la membrana plasmática. El aminofosfolípido neutro, la fosfatidiletanolamina (PE) está predominantemente en la cara interna. Los fosfolípidos neutros que contienen colina, fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (SM) están predominantemente en la cara externa.

5 La asimetría de la PS se mantiene mediante un transportador dependiente de ATP, la aminofosfolípido translocasa (Mg^{2+} ATPasa), que cataliza el transporte de aminofosfolípidos de la cara externa a la cara interna de la membrana plasmática (Seigneuret y Devaux, 1984). La pérdida o colapso de la simetría de la PS da como resultado el desplazamiento de estos fosfolípidos hacia el exterior en la membrana plasmática y está producido por la inhibición de la translocasa (Bitbol *et al*, 1987; Comfurius *et al*, 1990), la activación de transportadores de PS y/o la activación de enzimas escramblasas (Zhao *et al*, 1998) o de la ABC-1 flopasa (Hamon *et al*, 2000), enzimas dependientes de Ca^{2+} que transportan todos los lípidos bidireccionalmente. La esfingomielinasa también podría activarse para generar ceramida, lo que facilitaría la translocación de la bicapa de transición lipídica (Contreras *et al*, 2003).

10 La pérdida de asimetría de la PS se observa en diferentes condiciones patológicas y fisiológicas, incluyendo daño celular, muerte celular programada y apoptosis (Blankenberg *et al*, 1998; Bombeli *et al*, 1997), envejecimiento celular (Herrmann y Devaux, 1990), activación de plaquetas (Rote *et al*, 1993; Zwaal *et al*, 1989), lesión (Boyle *et al*, 1996) y transformación neoplásica (Sugimura *et al*, 1994). La exposición de PS también desempeña una función en la fusión intercelular de mioblastos (Sessions y Horwitz, 1981) y trofoblastos (Adler *et al*, 1995), migración celular (Vogt *et al*, 1996) y desgranulación celular (Demo *et al*, 1999). Las células endoteliales externalizan PS en respuesta a flujos de Ca^{2+} aumentados inducidos por trombina (Qu *et al*, 1996), ionóforo de calcio o ésteres de forbol (Julien *et al*, 1997), hiperlipidemia (Lupu *et al*, 1993), y concentración no lífticas de proteínas C5b-9 del complemento (Christiansen *et al*, 1997). La exposición espontánea de PS se ha observado también en células neoplásicas en ausencia de activadores exógenos o lesión celular (Utsugi *et al*, 1991).

Después de la exposición de PS en la membrana se producen diversas consecuencias principales. Los macrófagos fagocíticos reconocen, se ponen en contacto y eliminan células senescentes y apoptóticas positivas a PS (McEvoy *et al*, 1986; Tait y Smith, 1999). La PS también actúa como mediadora en la unión de linfocitos T a células endoteliales activadas por trombina (Qu *et al*, 1996). El sistema del complemento está activado por PS y contribuye a la lisis de células positivas a PS (Test y Mitsuyoshi, 1997). Finalmente, la exposición de PS contribuye a un cambio procoagulante en el endotelio (Williamson y Schlegel, 1994; Bombeli *et al*, 1997) proporcionando una superficie lipídica cargada negativamente para el ensamblaje y la activación de complejos de coagulación (Beverly *et al*, 1985; Dachary-Prigent *et al*, 1996). Desde hace tiempo se ha reconocido el carácter protrombótico del endotelio tumoral (Donati y Falanga, 2001).

Los autores de la presente invención se percataron de que la lesión y la activación del endotelio tumoral estaba causada por: 1) citocinas derivadas de tumor, tales como interleucina-1 y factor de necrosis tumoral, que activan el endotelio e inducen la expresión de moléculas de adhesión celular (Shaughnessy *et al*, 1989; Orr *et al*, 2000); 2) especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) generadas por leucocitos que se adhieren al endotelio (Orr *et al*, 2000); y 3) ROS generadas por las propias células tumorales como un subproducto del metabolismo (Shaughnessy *et al*, 1989; Soares *et al*, 1994) o como resultado de la exposición a hipoxia seguido de reoxigenación (Zulueta *et al*, 1995). Estas observaciones sugirieron que los flujos de Ca^{2+} podrían generarse por estos estreses dentro del endotelio tumoral que, a su vez, causan la exposición de PS, a través de la activación de la escramblasa o inhibición de la aminofosfolípido translocasa.

Para detectar fosfolípidos aniónicos en la superficie celular, los autores de la invención generaron un nuevo anticuerpo monoclonal, 9D2, que reacciona con fosfolípidos aniónicos pero no con fosfolípidos neutros. Por tanto, el anticuerpo 9D2 se diferencia de los agentes de unión a aminofosfolípidos generales, ya que se une al aminofosfolípido aniónico, fosfatidilserina, pero no al aminofosfolípido neutro, fosfatidiletanolamina (PE). El anticuerpo 9D2 es también más específico para fosfolípidos aniónicos de lo que lo es ligando natural, la anexina V, que se une fuertemente a PE, además de a fosfolípidos aniónicos (Blankenberg *et al*, 1998).

Como se detalla en la presente solicitud, los autores de la invención descubrieron que el anticuerpo 9D2 y la anexina V se localizaban específicamente en el endotelio tumoral después de inyección intravenosa en ratones portadores de diversos tipos de tumores sólidos. Este hallazgo valida la hipótesis de los autores de la invención de que la fosfatidilserina y los fosfolípidos aniónicos comienzan a exponerse habitualmente en la superficie del endotelio vascular tumoral y que pueden usarse como moléculas diana para la terapia (y formación de imágenes) de tumores.

Uno de los principales hallazgos que surgen de la presente invención es que la fosfatidilserina y los fosfolípidos aniónicos se exponen en la superficie del endotelio tumoral (Ejemplo VI; Ran y Thorpe, 2002; Ran *et al*, 2002b). Este fenómeno se demostró usando dos reactivos independientes que se unen selectivamente a fosfolípidos aniónicos: un anticuerpo monoclonal, 9D2, desarrollado por los autores de la invención, particularmente para validar este punto, y la anexina V.

El anticuerpo 9D2 y la anexina V se unen con alta afinidad y especificidad a fosfatidilserina y a fosfolípidos aniónicos adsorbidos en plástico, como liposomas, o presentados en la superficie de la membrana de células endoteliales

activadas o apoptóticas *in vitro*. 9D2 se une fuertemente a PS, PA y CL, pero más débilmente a PI y PG. La anexina V se une a PE además de a PS, CL, PA, PI y PG, como se descubrió anteriormente (Andree *et al*, 1990; Schlaepfer *et al*, 1987; Boustead *et al*, 1993; Blackwood y Emst, 1990). El reconocimiento de la fosfatidilserina y de los fosfolípidos aniónicos por el anticuerpo 9D2 fue idéntico en presencia y ausencia de suero, lo que indicaba que la unión no precisaba de cofactores séricos. La unión de 9D2 a fosfolípidos aniónicos, no requirió iones Ca^{2+} , mientras que la unión de anexina V si requirió Ca^{2+} .

Estudios de bloqueo cruzado en placas cubiertas con PS mostraron que tanto el 9D2 como la anexina V no bloquean la unión entre sí con PS. Esto indica que los dos reactivos reconocen diferentes epítomos en la molécula de PS, o, más probablemente, formas diferentemente empaquetadas de PS. Se considera que la anexina V se une a superficies de PS planas, mientras que se considera que los anticuerpos anti-PS se unen a PS empaquetada hexagonalmente (Rauch y Janoff, 1990). Ambas formas están probablemente presentes en placas cubiertas con PS. Estos estudios prácticos de bloqueo cruzado (Ejemplo VI) también sirven para demostrar que los anticuerpos que compiten eficazmente por la unión a fosfolípidos aniónicos, es decir, se unen básicamente al mismo epítomo, pueden identificarse fácilmente una vez que se proporciona un anticuerpo de referencia (por ejemplo 9D2).

La presente solicitud también muestra que el anticuerpo 9D2 y la anexina V se localizan específicamente en vasos tumorales y en células tumorales en y cerca de regiones necróticas de todos los tumores examinados *in vivo* (Ejemplo VI). Entre el 15 % y el 40 % de los vasos sanguíneos en los tumores tienen endotelio positivo a fosfatidilserina. En cambio, ningún vaso sanguíneo en tejidos normales tiene fosfolípidos aniónicos detectables externalizados. Las células endoteliales tumorales que expresan PS son viables. Carecen de marcadores de apoptosis (caspasa-3 activa, TUNEL) son morfológicamente intactas y metabólicamente activas y los vasos son funcionales al transportar sangre y solutos.

La especificidad de la tinción del sistema vascular tumoral por 9D2 se demostró mediante: 1) la ausencia de tinción de vasos tumorales por IgM de rata control; 2) el bloqueo de la unión de 9D2 o anexina V a células endoteliales tratadas con H_2O_2 *in vitro* por liposomas preparados a partir de fosfolípidos aniónicos pero no neutros; 3) el hallazgo de que la extracción de fosfolípidos de secciones tumorales con detergentes o disolventes orgánicos suprimía la tinción y 4) la ausencia de localización de 9D2 o anexina V en el endotelio inactivo en órganos normales.

El principal fosfolípido aniónico que localiza el anticuerpo 9D2 o la anexina V en el sistema vascular tumoral es la fosfatidilserina, ya que es el fosfolípido aniónico más abundante y su exposición en la superficie celular está regulada por influencias ambientales o lesiones. Para examinar el mecanismo de exposición de los fosfolípidos aniónicos sobre las células endoteliales tumorales, se realizó una serie de estudios en los cuales las células endoteliales *in vitro* se trataron con diversos factores y condiciones que se sabía que estaban presentes en el microentorno tumoral (Ejemplo VII). La hipoxia seguida de reoxigenación, la acidez y la trombina aumentan la exposición de PS en células endoteliales viables a entre el 10 % y el 22 % del nivel observado cuando todas las células son apoptóticas. Las citocinas inflamatorias (TNF α e IL-1) también causaron una inducción débil, pero clara, de exposición de PS.

Estos hallazgos son coherentes con la posibilidad de que, en tumores, la exposición de fosfatidilserina en el endotelio vascular está inducida por hipoxia/reoxigenación en combinación con citocinas inflamatorias, trombina y acidez. Aunque no es necesario entender el mecanismo exacto para llevar a la práctica la presente invención, las células tumorales pueden generar especies reactivas de oxígeno como un subproducto del metabolismo o en respuesta a hipoxia (Zulueta *et al*, 1995). Las citocinas liberadas por las células tumorales pueden inducir moléculas de adhesión de leucocitos en el endotelio que actúan como mediadoras en la adherencia de macrófagos activados, células polimorfonucleares y plaquetas al endotelio tumoral y secreción de ROS adicional. Después, las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden inducir la translocación de PS a través de la oxidación de moléculas transportadoras que contienen tiol o de la peroxidación de lípidos (Herrmann y Devaux, 1990), posiblemente causando una entrada de Ca^{2+} o una liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Wang y Joseph, 2000). De hecho, se ha observado que los peróxidos inducen la exposición de PS en células endoteliales viables *in vitro* mediante un mecanismo que se relaciona con la oxidación de glutatión y/o peroxidación de lípidos, no con la apoptosis (van Gorp *et al*, 1999).

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

En estudios adicionales detallados en el presente documento, los autores de la invención generaron y caracterizaron el anticuerpo monoclonal denominado 3G4, que se dirige contra fosfatidilserina y fosfolípidos aniónicos. También se observa que este anticuerpo se localiza específicamente en tumores en las células endoteliales vasculares, reduce la vascularidad del tumor y el volumen plasmático y retrasan el crecimiento tumoral.

El anticuerpo 3G4 se une con alta afinidad a fosfolípidos aniónicos absorbidos a plástico y sobre la superficie de células apoptóticas o activadas en presencia de suero o β 2-glucoproteína I. El compañero de unión de 3G4 en las

células fue indistinguible con respecto al de la anexina A5 o al del anticuerpo 9D2 contra fosfolípidos aniónicos. Los tres reactivos se unen a grupos de ampollas membranosas que se asemejan a la membrana plasmática, coherente con otras observaciones en células endoteliales tratadas con H₂O₂ (van Gorp *et al*, 1999). Al igual que 9D2, 3G4 reconoce todos los fosfolípidos aniónicos ensayados, incluyendo fosfolípidos sintéticos que tienen ácidos grasos saturados, que son resistentes a oxidación, y lisofosfolípidos.

A diferencia de 9D2, la unión de 3G4 a fosfolípidos aniónicos estaba parcialmente inhibida en ausencia completa de suero y restablecía cuando se añadía la β 2-glicoproteína I. 3G4 reconoce por tanto un epítipo en complejos de lípido- β 2-glicoproteína I. Independiente, se observa que 3G4 es inocuo cuando se administra a animales, y no está asociado a efectos patológicos indicados en la bibliografía para anticuerpos asociados con el síndrome(s) antifosfolípido (APS, por *anti-phospholipid syndrome*).

3G4 se localiza específicamente en vasos tumorales y en células tumorales en y alrededor de regiones necróticas de tumores después de inyección en ratones portadores de tumores mamarios humanos ortotópicos MDA-MB-435. Un promedio de 40 \pm 10 % de vasos se unieron a 3G4. Los patrones de tinción fueron similares a los descritos en el presente documento usando 9D2 y anexina A5. El endotelio vascular en tejidos normales no se tiñó. En este sentido, 3G4 se diferencia de otros anticuerpos porque reconoce marcadores de vasos tumorales. La mayoría de los marcadores de vasos tumorales están presentes en vasos en los ovarios, un sitio de angiogénesis fisiológica, o en el riñón y en los islotes pancreáticos donde los vasos tienen alta permeabilidad (Thorpe, 2004).

La fosfatidilserina es el fosfolípido aniónico detectado principalmente por 3G4. La PS es el fosfolípido aniónico más abundante y el primero cuya exposición se sabe bien que está regulada por condiciones ambientales o lesiones (Zwaal y Schroit, 1997; Balasubramanian y Schroit, 2003). *In vivo*, la PS expuesta en vasos tumorales forma probablemente complejos con componentes del suero, tales como β 2-glicoproteína I, y probablemente el 3G4 se une a estos complejos. Como se observa a lo largo de los presentes estudios, los vasos tumorales positivos a PS en ratones no tratados parecen estar intactos y ser funcionales. Transportan sangre y son perfundibles. El endotelio vascular de los vasos positivos a PS no presenta marcadores de apoptosis avanzada (caspasas 3 activa, TUNEL), es morfológicamente intacto y metabólicamente activo, a juzgar por la expresión simultánea de la proteína VCAM-1, rápidamente renovada.

El tratamiento con 3G4 retrasó el crecimiento tumoral en diversos modelos murinos, incluyendo cánceres de mama establecidos (de 0,6 a 0,7 cm de diámetro) ortotópicos humanos MDA-MB-231 y MDA-MB-435, tumores de Hodgkin humanos L540 subcutáneos grandes (de 1cm de diámetro) y fibrosarcomas Meth A singénicos pequeños. El tratamiento con 3G4 produjo un retraso de crecimiento de 75 %, 65 %, 50 % y 90 % de estos tumores, respectivamente. Otros estudios en la presente solicitud demuestran que estos tumores están nutridos por la vasculatura cuando se exponen a fosfolípidos aniónicos.

El efecto antitumoral de 3G4 está mediado, al menos en parte, a través de lesiones en el sistema vascular tumoral. El examen histológico de tumores MDA-MB-231 ortotópicos de ratones tratados con 3G4 reveló una notable reducción en la densidad vascular y en el contenido plasmático de los tumores. La localización de 3G4 en vasos tumorales precede a la unión de macrófagos en vasos tumorales, al deterioro de la función vascular y al desarrollo de necrosis. El cese vascular y el modelo de necrosis son coherentes con el efecto primario que está en los vasos tumorales. Se observó necrosis central de tumores con supervivencia de un borde periférico de células tumorales. Este patrón de destrucción de células tumorales es característico de los VTA (Patente de Estados Unidos n° 5.855.866; Thorpe, 2004). Se pensó que los VTA eran más eficaces contra vasos en el interior del tumor porque en estas regiones la alta presión intersticial contribuye al colapso vascular. En cambio, muchas terapias tumorales de acción directa son más eficaces contra células tumorales que se dividen rápidamente en la periferia bien oxigenada del tumor. Por lo tanto los autores de la invención esperan que combinando 3G4 con terapias antitumorales antiproliferativas se consiga una actividad antitumoral aditiva o incluso sinérgica, como se ha observado con los otros VTA en tumores sólidos experimentales (Patente de Estados Unidos n° 5,855,866; Burrows y Thorpe, 1993; Siemann *et al*, 2002; Siim *et al*, 2004).

Al igual que con los otros anticuerpos usados en el presente documento, los animales portadores de tumores tratados con regularidad con la dosis terapéutica (4 mg/kg en ratones, tres veces a la semana) toleran bien la terapia con 3G4. Los ratones conservaron síntomas físicos, parámetros de coagulación, celularidad de la médula ósea, recuentos de leucocitos e histología normales. No se observaron manifestaciones de APS, a diferencia de las observadas con anticuerpos anticardiolipina (Matzinger, 1998; Fadok *et al*, 1998; Fadok *et al*, 2001 a;b). A pesar de los efectos de altas concentraciones de 3G4 en rutas de coagulación dependientes de fosfolípidos parcialmente inhibidas, existe un margen de seguridad sustancial entre la dosis terapéutica y la dosis que prolonga los tiempos de coagulación *in vivo*.

Los autores de la invención han considerado la cuestión de si PS comienza a exponerse sobre endotelio vascular en lesiones no malignas (por ejemplo, lesiones ateroscleróticas, sitios de inflamación), donde las citocinas, hipoxia y ROS podrían inducir la translocación de PS (Moldovan *et al*, 1994). Si ocurre esto, es posible que se llegue a alguna toxicidad con un anticuerpo anti PS, haciendo que sea aconsejable la exclusión del tratamiento de pacientes con estas afecciones. Sin embargo, otros estudios de los autores de la invención, mostraron que el tratamiento de conejos ateroscleróticos con una versión quimérica del anticuerpo 3G4 no agravaba las lesiones ateroscleróticas

aórticas.

Se ha observado que los agentes de direccionamiento vascular que emplean fármacos o coagulantes son muy eficaces, y algunas veces curativos, en ratones con tumores sólidos grandes (Huang *et al*, 1997; Nilsson *et al*, 2001; Patentes de Estados Unidos nº 5.660.827, 5.776.427, 5.855.866, 5.863.538, 5.965.132, 6.004.554, 6.051.230, 6.261.535, 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289 y 6.036.955). Los autores de la presente invención proporcionan anticuerpos desnudos y agentes de direccionamiento vascular dirigidos contra fosfatidilserina para su uso en el direccionamiento del sistema vascular tumoral y en el diagnóstico y tratamiento del cáncer en seres humanos.

Aunque no es necesario un entendimiento molecular exacto de cómo funcionan los anticuerpos desnudos dirigidos contra fosfatidilserina en el tratamiento tumoral para llevar a la práctica el tratamiento, los autores de la invención han contemplado diversos mecanismos que pueden explicar la destrucción celular endotelial observada. Los mecanismos favorecidos (particularmente para el anticuerpo 3G4 descrito en el presente documento) son funciones inmunoefectoras mediadas por el dominio Fc, tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y fagocitosis mediada por anticuerpos. También pueden estar implicadas la citotoxicidad mediada por células, la lisis y/o la apoptosis mediada por el complemento, la señalización celular inducida por anticuerpos y/o las alteraciones en el citoesqueleto.

La unión de anticuerpos intactos contra fosfatidilserina, particularmente 3G4, en la superficie de las células endoteliales vasculares significa que las partes Fc de los anticuerpos sobresalen hacia el interior del lumen del vaso. Como los fragmentos Fc del anticuerpo activan la ruta del complemento, la destrucción celular observada puede ser un resultado de la lisis dirigida por el complemento. Por tanto, la unión de los anticuerpos activa la cascada de coagulación dependiente del complemento, causando complejos de componentes múltiples para ensamblar y, finalmente, generar un complejo lítico que permeabilice la célula diana. La "ADCC activada por el complemento" también puede ser operativa en la destrucción, en la que el complemento se une a la célula diana cubierta con anticuerpo, y en cuyas células, tales como neutrófilos, que tienen receptores para el complemento, se produce la lisis de la célula diana.

Dado que los anticuerpos desnudos o no conjugados, incluyendo los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se unen a fosfatidilserina en la superficie de las células endoteliales vasculares tumorales, estos formarán un recubrimiento de anticuerpo en la superficie luminal. Este puede funcionar atrayendo células inmunoefectoras, tales como linfocitos T citotóxicos y/o linfocitos citolíticos naturales (NK, *Natural Killer*), que después ejercen un efecto citotóxico mediado por células en las células endoteliales vasculares.

La unión de los anticuerpos a fosfatidilserina también puede inducir la apoptosis en las células endoteliales vasculares tumorales. Aunque no se conocen informes de que la unión de anticuerpos a PS realmente induzca la apoptosis (siendo más bien la PS un marcador resultante de apoptosis), los autores de la invención consideran que este es otro mecanismo posible para los efectos antitumorales observados.

También es posible que la unión de los anticuerpos a fosfatidilserina en la superficie de las células endoteliales vasculares tumorales pueda ocasionar alteraciones en la organización del citoesqueleto de la célula.

Dado que el citoesqueleto representa una función en la organización de las membranas de superficie, y dado que la unión del anticuerpo puede alterar (o alterar adicionalmente) la membrana, la unión de anticuerpos a fosfatidilserina puede transmitir cambios en las proteínas del citoesqueleto que interaccionan con la bicapa. Ya se sabía que la organización espacial de las proteínas del citoesqueleto controla la estabilidad de la membrana y la forma de la célula, y es posible que la alteración de algún equilibrio del citoesqueleto pueda tener consecuencias de gran repercusión sobre la integridad celular.

Un mecanismo operativo adicional de la invención puede ser que la unión del anticuerpo a fosfatidilserina en la superficie de células endoteliales puede iniciar una transducción de señal mediante rutas, hasta ahora, no definidas. La unión de anticuerpo también puede alterar rutas de transducción de señal conocidas, por ejemplo, modificando la conformación y/o interacciones de los receptores de membrana, proteínas de transducción de señal, canales de membrana y similares. Las señales para la destrucción celular (apoptosis) pueden iniciarse o imitarse, y/o pueden inhibirse señales de preservación/homeostáticas.

Aunque es de interés científico, la determinación de la naturaleza exacta de la destrucción vascular conseguida por los anticuerpos desnudos contra fosfatidilserina no es necesaria para llevar a la práctica el tratamiento. Dado que se muestra que la administración de estos anticuerpos da como resultado ventajosamente efectos antitumorales específicos *in vivo*, el tratamiento puede utilizarse independientemente del mecanismo molecular subyacente a este fenómeno. Por tanto el uso de anticuerpos desnudos que se unen a fosfatidilserina representa un avance importante en la terapia tumoral, proporcionando ventajas en su preparación y costes.

C. Análisis detallado del anticuerpo 3G4

Como se muestra en el presente documento, 3G4 es un agente antitumoral eficaz y bien tolerado, que actúa dirigiéndose a la fosfatidilserina en vasos sanguíneos tumorales y causando efectos antitumorales mediados por células hospedadoras. Dado que la PS es la misma molécula en el ser humano y en el ratón, y que tiene la misma

distribución celular, regulación e inducción por ROS en ambas especies (Balasubramanian y Schroit, 2003; Whitworth *et al*, 1990), estos estudios propugnan adicionalmente el uso de anticuerpos y de otras construcciones que se unen a fosfatidilserina para tratar el cáncer en seres humanos. De hecho, ya se han preparado versiones quiméricas y humanizadas de 3G4 para estas y otras finalidades.

- 5 Por tanto se pueden usar anticuerpos y otros ligandos que se unen a fosfatidilserina para el direccionamiento, la formación de imágenes y/o el tratamiento de vasos sanguíneos tumorales. La fosfatidilserina es atractiva como diana en vasos tumorales por diversas razones: es abundante (la PS está presente a 3×10^6 moléculas por célula); está en la superficie luminal del endotelio tumoral, que es directamente accesible para la unión mediante agentes de
10 direccionamiento vascular en la sangre; está presente en un mayor porcentaje de células endoteliales tumorales en diversos tumores sólidos; y no está esencialmente presente en el endotelio de todos los tejidos normales.

Se ha observado que el anticuerpo 3G4 se localiza específicamente en células endoteliales vasculares en tumores, reduce la vascularidad tumoral y el volumen del plasma y retrasa el crecimiento tumoral (como ejemplos de esto; Ran *et al*, 1998; Ran y Thorpe, 2002; Ran *et al*, 2002b; Ran *et al*, 2005; Huang *et al.*, 2005).

- 15 Estudios en curso han demostrado que el tratamiento con 3G4 inhibe el crecimiento de aloinjertos tumorales murinos y xenoinjertos tumorales humanos (como ejemplos de esto; Ran *et al*, 2005), incluyendo tumores de mama humano ortotópicos (Ejemplo XX; Huang *et al*, 2005), y tumores pancreáticos humanos ortotópicos (Ejemplo XX; Beck *et al*, 2005). 3G4 también inhibe la propagación metastásica y el crecimiento de estos tumores (Ejemplo XX; Huang *et al*, 2005; Beck *et al*, 2005). Cuando se usa en combinación, 3G4 potencia la eficacia terapéutica de los fármacos
20 quimioterapéuticos docetaxel y gemcitabina para el tratamiento de tumores mamarios y pancreáticos, respectivamente (Ejemplo XX; Huang *et al*, 2005; Beck *et al*, 2005).

- Al igual que con los otros anticuerpos usados en el presente documento, los animales portadores de tumores tratados con regularidad con la dosis terapéutica (4 mg/kg en ratones, tres veces a la semana) toleran bien la terapia con 3G4. Los ratones conservaron síntomas físicos, parámetros de coagulación, celularidad de la médula ósea,
25 recuentos de leucocitos e histología normales. A pesar de los efectos de concentraciones muy altas de 3G4 en rutas de coagulación dependientes de fosfolípidos parcialmente inhibidas, existe un margen de seguridad sustancial entre la dosis terapéutica y la dosis que prolonga los tiempos de coagulación *in vivo*. Por lo tanto 3G4 es un agente antitumoral eficaz y bien tolerado, que actúa dirigiéndose a fosfolípidos aniónicos en vasos sanguíneos tumorales y causando efectos antitumorales mediados por células hospedadoras. 3G4 no está asociado con los efectos patógenos publicados en la bibliografía de anticuerpos asociados con el síndrome (o síndromes) antifosfolípido.

- 30 El síndrome (o síndromes) antifosfolípido (APS) está asociado con autoanticuerpos denominados anticuerpos “anticardiopina” y “anticuerpos anticoagulantes lúpicos”. Estos síndromes están asociados con una predisposición hacia tromboembolia venosa y arterial, trombocitopenia y diversos síndromes neurológicos. Los anticuerpos antifosfolípidos en estos pacientes son por tanto “anticuerpos patógenos”. Dichos anticuerpos antifosfolípidos en la
35 población humana aparecen en el lupus eritematoso sistémico (Branch *et al*, 1987; Staub *et al*, 1989; Drouvalakis y Buchanan, 1998; Smirnov *et al*, 1995; Rauch *et al*, 1986; Rauch y Janoff, 1990) y están asociados con pérdida recurrente del embarazo (Rote *et al*, 1995; Rote, 1996; Vogt *et al*, 1996; 1997; Katsuragawa *et al*, 1997).

- Aunque descritos durante años como “anticuerpos antifosfolípidos” y “anticuerpos anti PS”, dichos anticuerpos patógenos en realidad reconocen cofactores de proteína que se unen a cardiopina, a PS o a ambos, no a los
40 propios fosfolípidos (Galli *et al*, 1990; 1993; McNeil *et al*, 1990; Rote, 1996). Hay una considerable heterogenicidad en los anticuerpos patógenos. Se han descrito determinados anticuerpos anticardiopina que reconocen regiones particulares en la β 2-glucoproteína I, mientras que los anticuerpos anticoagulantes lúpicos reconocen la protrombina. De manera similar, los anticuerpos anti-PE que se producen en patologías se unen a PE en combinación con proteínas, tales como quinínogeno de alto peso molecular (HK), precalicreína y factor XI (Sugj y McIntyre, 1995; 1996a; 1996b).

- 45 En la selección de anticuerpos para su administración como agentes terapéuticos, se descubrió por tanto que dichos anticuerpos deberían identificarse basándose en la no unión a fosfatidilserina en combinación con cofactores de proteína, más bien deben buscarse anticuerpos antifosfatidilserina “verdaderos” (documento WO 2004/006847).

- Sin embargo, estudios *in vitro* adicionales del anticuerpo 3G4 revelaron que, a diferencia de 9D2, la unión de 3G4 a fosfatidilserina y a fosfolípidos aniónicos estaba parcialmente inhibida en ausencia completa de suero. Además, se
50 descubrió que la unión se reestablecía cuando se unía β 2-glucoproteína I (β 2GPI). Esto impulsó a los inventores a pensar que 3G4 reconoce un epítipo en complejos lípido- β 2GPI, de tal manera que la interacción entre 3G4 y PS es independiente en β 2GPI (solicitud provisional de Estados Unidos n° de serie 60/646,333, presentada el 24 de enero del 2005; Ran *et al*, 2005). Los autores de la invención pensaron que la PS expuesta en vasos tumorales *in vivo* forma probablemente complejos con otros componentes séricos, tales como β 2GPI y que 3G4 probablemente se
55 une a estos complejos.

El potencial de 3G4 para unirse a un complejo PS- β 2GPI fue muy sorprendente, no solo porque se había observado que 3G4 era inocuo cuando se administraba a animales en numerosos estudios, y no se asociaba a efectos patógenos publicados en la bibliografía para anticuerpos asociados con APS, cuyos anticuerpos se sabe que se

unen a complejos de lípido-proteína en suero, incluyendo complejos PS- β 2GPI. No se ha observado ninguna de las manifestaciones de APS en ningún tratamiento con 3G4, a diferencia de las observadas con anticuerpos anticardiolipina contra β 2GPI (Matzinger, 1998; Fadok *et al*, 1998; Fadok *et al*, 2001a;b). Los ratones tratados con 3G4 a altas dosis durante periodos prolongados no mostraron cambios en la capacidad de coagulación, a pesar de que los ratones respondieron con APS cuando recibieron inyección de anticardiolipina o anticuerpos anticoagulantes lúpicos.

La presente invención resuelve esta discrepancia, aclara la interacción de 3G4 y β 2GPI necesaria para la unión a células endoteliales con PS expuesta y explica como 3G4 puede unirse a un complejo PS- β 2GPI sin sucumbir a las toxicidades asociadas con los anticuerpos patógenos previamente conocidos.

Como se muestra en el Ejemplo XXX, la interacción entre 3G4 y PS es dependiente de β 2GPI. Aunque β 2GPI se une a fosfolípidos aniónicos débilmente en condiciones fisiológicas, la presente invención muestra que 3G4 potencia enormemente la unión de β 2GPI con células endoteliales positivas a PS. Los datos muestran que se requieren complejos divalentes 3G4/ β 2GPI para potenciar la unión, dado que los fragmentos Fab' de 3G4 no se unen a células endoteliales con PS expuesta. También demuestran que una construcción β 2GPI dimérica artificial se une a células endoteliales con PS expuesta si necesidad de 3G4. En su conjunto, estos datos sugieren que 3G4 actúa sobre células positivas a PS, incluyendo células endoteliales tumorales, aumentando la afinidad de β 2GPI por PS mediante la formación de un complejo divalente 3G4/ β 2GPI.

El Ejemplo XXX también demuestra que 3G4 se une al dominio II de β 2GPI. Esto es importante, ya que los anticuerpos de pacientes con APS que reconocen el dominio II de β 2GPI no son patógenos. Por otro lado, un estudio reciente significativo demostró que los anticuerpos anti- β 2GPI patógenos aislados de pacientes con APS normalmente reconocen el dominio I de β 2GPI (de Laat *et al*, 2005a). La capacidad del anticuerpo 3G4 para unirse a complejos PS- β 2GPI sin unirse al dominio I de β 2GPI es importante en la falta de toxicidad que presenta el anticuerpo. β 2GPI también puede interactuar con el receptor 2' de apolipoproteína E (apoER2') (Lutters *et al*, 2003). Otro estudio reciente indicó que el dominio V de β 2GPI interactúa con apoER2' y que está implicado en la activación de plaquetas, lo que causa un aumento en la deposición de plaquetas en el colágeno (van Lummel *et al*, 2005).

Por consiguiente, mediante la unión ni al dominio I ni al dominio V, el anticuerpo 3G4 puede unirse al complejo PS- β 2GPI e incluso no mostrar toxicidad después de amplios estudios toxicológicos realizados en diversos modelos animales. A la luz de estos descubrimientos, ahora pueden prepararse otros anticuerpos que se unen a complejos PS- β 2GPI y usarse de manera segura en el tratamiento de diversas afecciones, tales como cáncer e infecciones víricas. La selección de anticuerpos que no se unen significativamente al dominio I de β 2GPI es normalmente el requisito principal, y se contempla que la selección de anticuerpos que no se unen significativamente al dominio I de β 2GPI o al dominio V de β 2GPI proporciona ventajas adicionales.

En revisión, los nuevos estudios han caracterizado la interacción entre el anticuerpo 3G4 y su principal diana de fosfolípido aniónico, la fosfatidilserina. Los datos demuestran que la interacción entre 3G4 y PS es dependiente de suero. β 2GPI se identificó como el factor sérico necesario para mediar la interacción entre 3G4 y PS.

3G4 se generó originalmente inmunizando ratones con células endoteliales murinas tratadas con H₂O₂ para inducir la exposición a PS (Ejemplo IV; Ran *et al*, 2005). Las células se cultivaron en medios que contenían FBS y probablemente inyectados con una pequeña cantidad de β 2GPI bovina, lo que conduce a la producción de anticuerpos anti-PS/ β 2GPI. Se realizaron exploraciones iniciales de anticuerpos con respecto a su reactividad con PS en presencia de suero bovino. Después se realizaron exploraciones en ausencia de suero, pero como se indica en el presente documento, el anticuerpo purificado de SCM se purificó simultáneamente con el antígeno β 2GPI. Por lo tanto, el anticuerpo "purificado" puede unirse a PS en ausencia de suero debido a la presencia de β 2GPI bovina contaminante. Únicamente cuando 3G4 se cultivó y se purificó de medios asépticos se identificó la dependencia del suero. Otros grupos han descrito cuestiones similares con respecto a la obtención de preparaciones de anticuerpos anti- β 2GPI sin β 2GPI (Roubey *et al*, 1995). Por lo tanto, es muy posible que muchos de los denominados "anticuerpos antifosfolípidos" que se presentan como que se unen directamente a fosfolípidos, realmente reconozcan proteínas séricas con afinidad por fosfolípidos.

La β 2GPI es una glucoproteína de 50 kDa que está presente en el plasma a una concentración de ~200 μ g/ml (4 μ M) (Cleve *et al*, 1969). La proteína es un miembro de la familia de proteínas de control del complemento (PCC) (Steinkasserer *et al*, 1991). La β 2GPI tiene cinco repeticiones PCC en la que los cuatro primeros dominios son repeticiones regulares que constan de ~60 aminoácidos. El quinto dominio se diferencia de los cuatro dominios restantes ya que tiene 82 aminoácidos, incluyendo un grupo de aminoácidos con carga positiva (282-287) y una región hidrófoba conservada (311-317) responsable de la unión de β 2GPI a fosfolípidos aniónicos (Steinkasserer *et al*, 1992; Huntand Krilis, 1994; Sheng *et al*, 1996; Mehdi *et al*, 2000).

Se sabe poco sobre la función biológica normal de β 2GPI. Las funciones propuestas incluyen facilitación de la eliminación de células apoptóticas (Balasubramaniam *et al*, 1997b; Balasubramaniam *et al*, 2005), modulación de la función plaquetaria (Nimpf *et al*, 1985; Nimpf *et al*, 1987) e inhibición de la coagulación (Nimpf *et al*, 1986; Schousboe, 1985); sin embargo, no se ha observado un fenotipo definitivo en ratones o en pacientes con déficit de

β 2GPI (Mikakis *et al.*, 2004; Yasuda *et al.*, 2000).

En cambio, la β 2GPI es muy conocida por su implicación en el trastorno autoinmunitario APS, donde se ha identificado como un cofactor plasmático necesario para la unión de los denominados anticuerpos antifosfolípidos (aPL) a superficies de fosfolípidos aniónicos (de Laat *et al.*, 2004a; Bevers *et al.*, 2004). Se sabe que los anticuerpos antifosfolípidos interactúan con diversas proteínas séricas, pero que los anticuerpos aPL que reconocen la β 2GPI se correlacionan más fuertemente con los síntomas clínicos del APS (de Laat *et al.*, 2004b). Por lo tanto, la interacción entre la β 2GPI, los anticuerpos anti- β 2GPI y las superficies de membrana de fosfolípidos aniónicos se ha estudiado intensivamente (Bevers *et al.*, 2004).

Los presentes estudios también examinaron las características de la unión de 3G4 a placas de microtitulación cubiertas con PS y a células endoteliales con PS expuesta. Usando un ensayo de unión con células vivas, se determinó que ni 3G4 ni β 2GPI se unían a células endoteliales con PS expuesta salvo que ambas moléculas estuviesen presentes simultáneamente (Ejemplo XXX). Esta observación es coherente con el hallazgo basado en un ensayo ELISA que demuestra que 3G4 depende de β 2GPI para unirse a superficies de lípidos aniónicos. Además, esta observación confirma los informes de que la β 2GPI tiene baja afinidad por membranas de fosfolípidos aniónicos en condiciones fisiológicas (Willems *et al.*, 1996; Bevers *et al.*, 2004; Bevers *et al.*, 2005) y sugiere que la afinidad está enormemente potenciada por la presencia de 3G4.

Los datos también demuestran que 3G4 potencia la afinidad de β 2GPI por superficies de fosfolípidos aniónicos mediante la formación de complejos divalentes β 2GPI. Cuando la concentración de β 2GPI permanece constante y la concentración de 3G4 aumenta, la unión de 3G4/ β 2GPI a células endoteliales con PS expuesta, alcanza una proporción máxima de 3G4 con respecto a β 2GPI de 2:1. A mayores concentraciones de 3G4, la unión disminuye. La curva con forma de campana sugiere competición entre complejos monovalentes y divalentes, lo que conduce a una disminución en la unión global del complejo 3G4/ β 2GPI. Se ha descrito una relación con forma de campana para anticuerpos anti- β 2GPI en un modelo de trombosis (Jankowski *et al.*, 2003). En otros estudios, los fragmentos Fab de 3G4 no se unieron a células endoteliales con PS expuesta en presencia de β 2GPI, lo que demuestra que los complejos monovalentes 3G4/ β 2GPI no pueden unirse a superficies de fosfolípidos aniónicos.

También se demostró que las construcciones β 2GPI diméricas artificiales podían unirse a células endoteliales con PS expuesta sin necesidad de 3G4. Por lo tanto, los anticuerpos anti- β 2GPI aumentan la afinidad de β 2GPI por superficies de fosfolípidos aniónicos entrecruzando dos moléculas β 2GPI, formando un complejo β 2GPI divalente.

Cabe destacar que, aunque los complejos 3G4/ β 2GPI interactúan con PS casi como los anticuerpos aPL de pacientes con APS, 3G4 no ha producido manifestaciones clínicas de APS en ningún modelo animal ensayado. El mecanismo (o los mecanismos) mediante el cual los anticuerpos antifosfolípidos aPL producen APS siguen siendo en gran parte desconocidos. Algunos estudios sugieren que aPL/ β 2GPI puede unirse y activar células endoteliales en reposo (que no exponen PS), haciendo que adopten un fenotipo más trombogénico (Simantov *et al.*, 1995; Pierangeli *et al.*, 1999). Estudios más recientes demuestran que β 2GPI y los complejos aPL/ β 2GPI no pueden unirse y activar complemente a las células endoteliales a menos que ya estén previamente activadas (Chen *et al.*, 2004). La preactivación hace que las células endoteliales expongan PS, proporcionando la superficie fosfolípídica aniónica apropiada para la unión de complejos aPL/ β 2GPI.

3G4 no se une a células ABAE o a células HUVEC en reposo en un ensayo con células vivas. Además, 3G4 no activa células HUVEC en reposo o células HUVEC preactivadas con bajas concentraciones de LPS. Recientes estudios indican una alta correlación entre la presencia de anticuerpo aPL que reconocen el dominio I de β 2GPI en sueros de pacientes y síntomas clínicos de APS (de Laat *et al.*, 2005) y puede necesitarse un cambio conformacional para la unión del anticuerpo (de Laat *et al.*, 2005b). Los anticuerpos que reconocen los otros dominios de β 2GPI también se detectan en los sueros de los pacientes, pero no se correlacionan con patogénesis. Cabe destacar, que la presente invención demuestra que 3G4 reconoce el dominio II de β 2GPI, lo que probablemente explica la ausencia de activación de células endoteliales *in vitro* y la ausencia de toxicidad *in vivo*.

El dominio II de la β 2GPI de ratón se diferencia del dominio II de la β 2GPI de rata, perro, vaca, chimpancé y ser humano únicamente en 7 de 60 aminoácidos. Por lo tanto, la incapacidad de 3G4 de unirse a PS en presencia de suero de ratón o de detectar la β 2GPI murina mediante inmunotransferencia es inesperada, especialmente a la luz de la actividad antitumoral documentada de 3G4 en ratones (los presentes ejemplos; Ran *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Beck *et al.*, 2005). Cabe destacar, que estos estudios se realizaron usando 3G4 purificado de SCM. Como se muestra en el presente documento, SCM de 3G4 puede unirse a PS, debido a la purificación simultánea de la β 2GPI bovina. Cuando SMC de 3G4 se procesó en un gel SDS-PAGE, se transfirió a un soporte de membrana y se exploró con respecto a la presencia de la β 2GPI bovina, se observó claramente una banda de 50 kDa. Además, el 3G4 presente en sueros recogidos de ratones después de inyección con SCM de 3G4 se unía a PS. Por lo tanto, la β 2GPI bovina puede actuar como mediadora en la unión de 3G4 a PS en plasma de ratón y posiblemente contribuye al efecto antitumoral de 3G4. Todos los estudios de tumores realizados en ratones usando 3G4 deben complementarse con β 2GPI bovina o humana para garantizar el direccionamiento de las células endoteliales tumorales con PS expuesta.

La identificación de β 2GPI como un importante cofactor necesario para la interacción entre 3G4 y PS potencia

enormemente el entendimiento de este exclusivo agente de direccionamiento vascular tumoral. 3G4 se dirige a células tumorales endoteliales con PS expuesta potenciando la afinidad de β 2GPI por superficies de fosfolípidos aniónicos mediante la formación de complejos diméricos β 2GPI. Además, para aclarar estas propiedades, los presentes estudios permiten ahora el desarrollo de anticuerpos de tercera generación que se unen a aminofosfolípidos y a fosfolípidos aniónicos en complejos con proteínas séricas, sin duplicar las propiedades de los anticuerpos patógenos.

En resumen, ahora pueden seleccionarse anticuerpos de “tercera generación” o “anticuerpos PS- β 2GPI no patógenos” preferidos que se unen a PS y a β 2GPI en una posición distinta en el dominio I de β 2GPI, o distinta en el dominio I o dominio V de β 2GPI. A la luz de los datos del presente documento los anticuerpos más preferidos son actualmente los que se unen a β 2GPI en el dominio II. Siguiendo la metodología y las técnicas de exploración descritas en el presente documento, por ejemplo, usando la información de secuencia de la FIG. 18A y FIG. 18B y los ensayos de unión del Ejemplo XXX, pueden prepararse diversos anticuerpos PS- β 2GPI no patógenos. Dichos anticuerpos e inmunoconjugados de los mismos pueden usarse ventajosamente en el tratamiento inocuo y eficaz de infecciones víricas y en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades.

D. Receptorcueros y betacueros

Los anteriores análisis detallados del anticuerpo 3G4, y particularmente la interacción de 3G4 con β 2GPI, que contrasta con la que se indica en el documento WO 2004/006847, también contribuyen al desarrollo de los inventores de los receptorcueros de la presente invención. Cabe destacar, que la presente invención también proporciona una serie de construcciones, denominadas “receptorcueros”, que se unen a fosfatidilserina, y suscitan funciones efectoras del hospedador. Más adelante se describen aspectos de este desarrollo de los receptorcueros.

En el presente documento se presentan datos que muestran que el direccionamiento al sistema vascular tumoral con anticuerpos contra fosfatidilserina es eficaz en el tratamiento tumoral. También se demostró que los anticuerpos contra fosfatidilserina eran eficaces en el tratamiento de infecciones víricas. Considerando los estudios de tumores como un ejemplo, en el presente documento se observó que las condiciones de estrés en el microentorno tumoral inducían la exposición de la fosfatidilserina en el endotelio vascular tumoral (Ejemplo VII, Ejemplo II, Ejemplo V y Ejemplo VI). La fosfatidilserina expuesta proporciona un marcador selectivo de sistema vascular tumoral para la formación de imágenes y terapia (Ejemplo IX, Ejemplo, X, Ejemplo XI y Ejemplo XX).

Junto con el tratamiento del tumor, los anticuerpos contra fosfatidilserina producen daños en los vasos sanguíneos en tumores y causan infiltración de leucocitos (por ejemplo, FIG. 1). Además, la administración de dichos anticuerpos hace que se recluten macrófagos en los tumores. Por ejemplo, en estudios de tratamiento de tumores usando el anticuerpo 3G4, se observó una extensa unión de monocitos sanguíneos en el endotelio vascular tumoral y una abundante infiltración de macrófagos en el interior del intersticio tumoral (por ejemplo, Ejemplo XXVII; FIG. 6A, FIG. 6B, FIG. 6C y FIG. 6D).

La infiltración de macrófagos en el tumor tratado, considerada en su conjunto con el hallazgo de que 3G4 potencia por cinco la tasa de fagocitosis de células que expresan PS por macrófagos de ratón procedentes de médula ósea *in vivo* de una manera dependiente de Fc, está en consonancia con anticuerpos tales como 3G4 que provocan citotoxicidad de macrófagos hacia los vasos tumorales o células tumorales. Además, 3G4 no inhibe directamente la proliferación de células endoteliales o de células tumorales que expresan PS, o median la lisis del complemento de las células *in vitro*, lo que sugiere que el anticuerpo no es directamente citotóxico.

Por este motivo los inventores proponen dos mecanismos factibles de lesión mediada por macrófagos en vasos tumorales o células tumorales. En primer lugar, los anticuerpos, tales como 3G4, se unen a complejos de fosfolípidos aniónicos, principalmente fosfatidilserina, y a proteínas séricas en vasos tumorales y en células tumorales. Después, los anticuerpos estimulan la unión de monocitos y macrófagos mediante receptores de Fc γ , potenciando de este modo la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) y la fagocitosis de macrófagos dependiente de anticuerpo. Desde hace tiempo los macrófagos activados se han reconocido como que tienen actividad tumoricida directa (Whitworth *et al*, 1990). Confirmando esto, Manfredi *et al* (1998) han descrito que los anticuerpos antifosfolípido pueden facilitar la opsonización de células que expresan PS mediante macrófagos eliminadores con inducción masiva de secreción de TNF- α . Aunque los macrófagos tienen receptores de PS y pueden unirse a células que expresan PS y engullirlas (Balasubramanian y Schroit, 2003; Utsugi *et al*, 1991; Fadok *et al*, 2001a), la exposición de PS solo no es suficiente para estimular el engullimiento (Devitt *et al*, 2003).

En segundo lugar, los anticuerpos, tales como 3G4, pueden bloquear las señales de “inactividad” mediadas por PS de células endoteliales tumorales que expresan PS, que normalmente suprimirían las respuestas inflamatorias por macrófagos que se unen a los vasos tumorales y células tumorales (FIG. 7). Se piensa que mecanismos análogos explican la ausencia de respuesta inflamatoria de las células de linaje macrófago contra células apoptóticas (Henson *et al*, 2001; Matzinger, 1998; Gallucci y Matzinger, 2001; Fadok *et al*, 2001b). Por consiguiente, anticuerpos tales como 3G4 pueden suscitar lesiones a los vasos tumorales provocando que los macrófagos secretan TNF- α , IL-1 y otras citocinas inflamatorias que producen daños directamente en el endotelio tumoral (FIG. 7) y reclutan adicionalmente células hospedadoras en el tumor (Fadok *et al*, 1998).

Idealmente, cada uno de los posibles mecanismos anteriores deben reconciliarse con la propuesta de que los macrófagos asociados a tumores pueden inducir la angiogénesis tumoral, lo que promueve el crecimiento tumoral (por ejemplo, Sunderkotter *et al*, 1994). Por lo tanto, los autores de la invención piensan que hay un equilibrio entre los efectos proangiogénicos de los macrófagos y sus efectos citotóxicos directos sobre vasos tumorales y células tumorales que se determina mediante condiciones locales (por ejemplo, hipoxia, TGF- β) en el microambiente tumoral (Breier *et al*, 2002). Actualmente se contempla que los anticuerpos, tales como 3G4, alteran el microentorno tumoral de una manera que favorece una respuesta citotóxica directa de los macrófagos.

Por lo tanto, considerando la biología de la fosfatidilserina, y opcionalmente la luz de los datos presentados en el presente documento con respecto al comportamiento de los macrófagos en el tratamiento tumoral, los autores de la invención proporcionan una serie de construcciones o "receptorcuerpos" ventajosos que se unen a fosfatidilserina, y opcionalmente a otros fosfolípidos aniónicos, y conjugados relacionados y métodos de uso.

Dicha construcción o receptorcuerpo de la invención comprenderá típicamente una proteína o un polipéptido, receptor, ligando o péptido de unión que reconozca y se una a fosfatidilserina, y opcionalmente a otros fosfolípidos aniónicos, cuya proteína o polipéptido receptor, ligando o péptido de unión, está ligado a un anticuerpo o región Fc de inmunoglobulina o dominio. La región Fc modifica la proteína o el polipéptido, el receptor, el ligando o el péptido de unión para aumentar su semivida biológica, pero lo que es más importante, proporciona la construcción resultante con la capacidad de estimular funciones efectoras del hospedador para potenciar el tratamiento de enfermedades.

Los receptorcuerpos de la invención pueden usarse en cualquiera de las realizaciones en las que puedan usarse anticuerpos contra fosfatidilserina. Dichos receptorcuerpos tienen por tanto múltiples aplicaciones, incluyendo la unión a fosfatidilserina en vasos sanguíneos tumorales y en células tumorales, lo que conduce a efectos anticelulares y antivascuales mediados por células hospedadoras en el tumor, y a la unión de fosfatidilserina en virus o en células infectadas con virus, lo que conduce a un efecto antivírico en animales.

Una de las ventajas de estos aspectos de la invención es que los receptorcuerpos usan proteínas, polipéptidos o receptores de unión a fosfatidilserina natural para conseguir una unión específica. Aunque en el presente documento se muestra que el uso de anticuerpos contra fosfatidilserina es eficaz en muchas realizaciones de tratamiento, los receptorcuerpos podrían tener mayor avidez o especificidad que los anticuerpos anti-PS. La dimerización de proteínas o polipéptidos de unión a fosfatidilserina, particularmente β 2GPI, sobre una región de inmunoglobulina Fc, hace que las construcciones obtengan mejor avidez, estabilidad, semividas *in vivo* más prolongadas, y posiblemente una localización superior en tejidos que expresan fosfatidilserina, así como estimulación de funciones efectoras del hospedador *in vivo*. En el presente documento se muestra que los anticuerpos anti-PS son eficaces e inocuos cuando se administran a animales, incluyendo monos. Del mismo modo, los receptorcuerpos que contienen los ligandos naturales serán eficaces e inocuos y no causarán síndromes antifosfolípido. Por consiguiente, los receptorcuerpos de la presente invención son agentes terapéuticos sencillos, humanos, específicos e inocuos, que pueden usarse para tratar una serie de tumores e infecciones víricas.

35 **D1. Proteínas de unión a fosfatidilserina**

La proteína o polipéptido, receptor, ligando o péptido de unión en los receptorcuerpos de la divulgación puede ser cualquiera de una de las diversas proteínas de unión a fosfatidilserina, incluyendo receptores derivados de células, factor V, protrombina (factor II) y similar. Se prefiere mucho el uso de la β 2-glicoproteína I.

Determinados factores en la cascada de coagulación también se unen a fosfatidilserina y por tanto pueden usarse en los receptorcuerpos de la divulgación. Por ejemplo, el factor V y la protrombina (factor II) se unen a fosfatidilserina. En el complejo protrombinasa, la unión del factor Va a una superficie de lípidos aniónicos promueve la unión dependiente de Ca^{2+} del factor Xa, que convierte la protrombina en trombina. En ambos complejos, la fosfatidilserina es el fosfolípido aniónico más eficaz. Por tanto, en la divulgación pueden usarse proteínas de unión a fosfatidilserina, Proteína C, Proteína S, Factor II/IIa, Factor V/Va, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa y Factor X/Xa.

Fadok *et al.* (2000) describieron la clonación de un receptor de PS que unía directamente a células apoptóticas. Este receptor se expresa en muchos tipos de células, incluyendo macrófagos, fibroblastos y células epiteliales. Los estudios usando anticuerpos y vesículas de PS indican que el receptor reconoce la fosfatidilserina en la superficie celular. Por tanto, este es un receptor específico de PS, "el receptor de PS" o "PSr" (Número de Registro AF304118). Este receptor está presente en fagocitos, tales como macrófagos, y también en otros tipos de células. Por tanto, el receptor de PS de Fadok *et al.* (2000) puede usarse en los receptorcuerpos de la divulgación.

En Balasubramanian y Schroit, 2003, en particular, véase Balasubramanian y Schroit, 2003, Tabla 2, y las referencias citadas en su interior, se describen otras proteínas de unión a fosfatidilserina que podrían usarse en los receptorcuerpos de la divulgación. Estas proteínas de unión a fosfatidilserina incluyen, por ejemplo, CD14; integrinas, tales como α 5 β 3 (vitronectina, CD51/CD61) y α 5 β 3/CD36; diversos receptores eliminadores, tales como SRB (CD36), SRC (LOX-1, SRCL), SRD (CD68, macrosialina) y PSOX; receptores del complemento, tales como CR3 (CD11b/CD18) (Número de Registro NM 000632), CR4 (CD11c/CD18) (Número de Registro NM 000887) y CD93 (cClqr, calreticulina)/CD91 (receptor de α 2-macroglobulina); y otros receptores tales como los compañeros de reconocimiento de fagocitos Mer/Gas 6 para células apoptóticas que expresan PS (Número de Registro AH010001).

- Aunque las anexinas, tal como la anexina V, pueden usarse como una proteína de unión a fosfatidilserina en un receptorcuerpo, su uso no es una parte universal de la presente invención. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la presente invención proporciona construcciones en las que la proteína de unión a fosfatidilserina no es una anexina. Sin embargo, la siguiente información se proporciona para su uso en aquellas realizaciones, en las que se contempla una anexina. Además, la información técnica que aparece en los documentos de patente de anexina, por ejemplo, con respecto a la expresión y conjugación, puede usarse para confirmar las otras construcciones de proteína de unión a fosfatidilserina-Fc de la divulgación.
- Se han identificado al menos nueve miembros de la familia de las Anexinas (de la Anexina I a la Anexina IX) en tejidos de mamífero. Actualmente, entre estas, se prefiere la Anexina V (también conocida como PAP-I). Las secuencias de ADN y proteínas de las Anexinas se conocen en la técnica, lo que facilita la producción fácil de proteínas de fusión recombinantes para su uso en estos aspectos de la divulgación.
- En la Patente de Estados Unidos nº 5.658.877, se describe la Anexina I, cantidades eficaces de Anexina I y composiciones farmacéuticas de las mismas. También se describen métodos de tratamiento de un animal para prevenir o aliviar los efectos adversos de la endotoxina en el pulmón, que comprende administrar en las vías respiratorias de un animal, una cantidad inocua de un fragmento de Anexina I de 33 kDa.
- La Anexina V contiene un grupo sulfhidrilo libre y no tiene ninguna cadena de hidrato de carbono unida. La estructura primaria de la anexina V deducida de la secuencia de ADNc muestra que la anexina V comprende cuatro unidades de repetición internas (Patente de Estados Unidos nº 4.937.324). La Patente de Estados Unidos nº 5.296.467 y el documento WO 91/07187 proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden "anexina".
- El documento WO 91/07187 proporciona derivados y análogos de anexina preparados de manera natural, sintética o genética. Las anexinas particulares constan de 320 aminoácidos que contienen aminoácidos variantes y opcionalmente un puente disulfuro entre la Cys 316 y la Ala 2.
- La Patente de Estados Unidos nº 5.296.467 describe adicionalmente anexinas y composiciones farmacéuticas de las mismas. La Patente de Estados Unidos nº 5.296.467 describe la clonación, la expresión recombinante y la preparación de anexina. También se desvelan agregados de dos o más anexinas, por ejemplo, ligados por enlaces disulfuro entre uno o más grupos de cisteína sobre la anexina respectiva. En el documento WO 95/27903 se proporciona otro ejemplo más de materiales de partida de anexina adecuados, que proporciona anexinas para su uso en la detección de células apoptóticas.
- La Patente de Estados Unidos nº 6.197.278 también facilita y ofrece una descripción de las anexinas en un sentido genérico, su administración segura y eficaz *in vivo* y realizaciones de formación de imágenes. Lo siguiente describe materiales de partida de anexina apropiados para la preparación de construcciones, también se identifican cada una de las estrategias de diagnóstico de la Patente de Estados Unidos nº 5.627.036; documentos WO 95/19791; WO 95/27903; WO 95/34315; WO 96/17618; y WO 98/04294. Diversos de estos documentos también se refieren a vectores de expresión recombinante útiles.
- La Patente de Estados Unidos nº 5.632.986 también se proporciona con el fin de describir adicionalmente el aislamiento de la anexina de extractos de tejido (Patente de Estados Unidos nº 4.937.324) y la producción de anexina por métodos recombinantes. Por tanto, se identifica cada uno de los clones de ADNc y vectores de expresión de la Patente de Estados Unidos nº 5.632986.
- La Patente de Estados Unidos nº 5.632.986 describe adicionalmente mutantes y variantes de la molécula de anexina que se subdividen o modifican en uno o más restos de aminoácidos siempre que la capacidad de unión del fosfolípido no se reduzca sustancialmente. Las anexinas apropiadas para su uso pueden por tanto truncarse, por ejemplo, para incluir uno o más dominios o contener menos restos de aminoácidos que en la proteína nativa, o pueden contener aminoácidos sustituidos. Se acepta cualquier cambio siempre que la muteína o molécula de anexina de segunda generación no contenga sustancialmente menor afinidad por el aminofosfolípido. El mismo razonamiento se aplica a proteínas que no son anexinas.
- En la Patente de Estados Unidos nº 5.632.986 también se describe el entrecruzamiento químico de las anexinas y otros agentes. Todas estas técnicas pueden adaptarse para su uso con las mismas sustituyendo simplemente los agentes trombolíticos de las regiones Fc descritas en el presente documento. Por tanto, pueden usarse diaminas alifáticas; ésteres de succinimida, agentes de acoplamiento heterobifuncionales, tales como SPDP; compuestos de maleimida, enlazadores con espaciadores; y similares. Estos agentes también pueden usarse con proteínas que no son anexinas.
- La Patente de Estados Unidos nº 5.632.986 se identifica específicamente también con el fin de describir la producción recombinante de los conjugados que contienen anexina. Las secuencias de ácido nucleico apropiadas se unen por tanto para producir secuencias codificantes quiméricas que, a su vez, producen proteínas quiméricas. Los vectores de expresión ejemplares se dice que son pKK233-2 (*E. coli*), DPOT (levadura) y pDSP1.IBGH (mamífero). Dichas enseñanzas se complementan con información adicional proporcionada en el presente documento.
- Cada una de las Patentes de Estados Unidos nº 6.312.694, 6.783.760 y 6.818.213 se identifican con el fin de incluir

adicionalmente y proporcionar una descripción detallada de las proteínas de unión a fosfatidilserina en un sentido genérico, y su administración inocua y eficaz *in vivo*. Estas patentes desvelan composiciones de ligandos de unión en las que un agente terapéutico está conectado operativamente a un agente diana que se une a fosfatidilserina, preferentemente fosfatidilserina expuesta en la superficie luminal de vasos sanguíneos de un tumor vascularizado, y métodos de tratamiento del cáncer usando dichos ligandos de unión y combinaciones de los mismos. Aunque estas patentes no enseñan ni sugieren las proteínas de unión a fosfatidilserina ligadas a una región Fc, desvelan proteínas de unión a fosfatidilserina, agentes terapéuticos unidos y métodos de tratamiento *in vivo* inocuos y eficaces.

Las Patentes de Estados Unidos nº 6.312.694, 6.783.760 y 6.818.213 se refieren particularmente a ligandos de unión en los que un agente terapéutico está conectado operativamente a al menos una primera proteína de unión a fosfatidilserina. Aunque en estas patentes las proteínas están relacionadas con agentes terapéuticos y se usan para suministrar los agentes terapéuticos al sistema vascular tumoral sin una región Fc, y por tanto no suscitan funciones efectoras de células hospedadoras, estas patentes también permiten y describen conjugados de proteína y su administración inocua y eficaz *in vivo*, incluyendo para tratar el cáncer. Por tanto, usando la información de estas patentes y las enseñanzas de la presente divulgación, puede prepararse una serie de receptorcuerpos en los que una proteína de unión a fosfatidilserina, o un fragmento de unión a fosfatidilserina de los mismos, se liga ahora con una región Fc o dominio.

La β 2-glicoproteína I (β 2GPI) es la proteína de unión a fosfatidilserina actualmente preferida para su uso en los receptorcuerpos de la invención. La β 2GPI, también conocida como apolipoproteína H, es una glicoproteína plasmática de 50 kDa que se une a fosfolípidos cargados negativamente a través de su extremo C (Wurm, 1984). Se proporcionan los siguientes números de registro para la B2GPI humana (NP 000033, AAP72014 e ICIZA) y para la B2GPI de ratón (AAH53338, NP 038503, CAA69401, BAB2721). Pruebas realizadas *in vitro* e *in vivo* indican que la β 2GPI desempeña una función en la eliminación de células apoptóticas que expresan PS (Chonn *et al.*, 1995; Balasubramanian *et al.*, 1997; Balasubramanian y Schroit, 1998). Las interacciones de β 2GPI con fagocitos son electroestáticas en la naturaleza y la glucosilación de proteínas no es crítica para el reconocimiento de fagocitos. Por consiguiente, no hay obstáculos significativos para la producción recombinante de β 2GPI para su uso en receptorcuerpos.

Cuando se usa una proteína, polipéptido o péptido de β 2GPI en la invención, la construcción Fc- β 2GPI resultante se denomina "betacuerpo". Los betacuerpos incluirán preferentemente una región de unión a lípidos a partir del dominio V de β 2GPI, como se muestra en el presente documento en la FIG. 18A y FIG. 18B. Las construcciones que contienen todo el dominio V pueden preferirse para garantizar la unión a lípidos. El dominio V puede usarse en solitario, o con uno o más de los cuatro dominios restantes. Aunque el uso de la proteína β 2GPI de longitud completa será conveniente, los betacuerpos que no contengan el dominio I de β 2GPI pueden preferirse en determinados aspectos, ya que los anticuerpos de pacientes con APS reconocen comúnmente el dominio I de β 2GPI (de Laat *et al.*, 2005a).

Otros betacuerpos preferidos son aquellos en los que dos polipéptidos de β 2GPI están dimerizados sobre una región Fc. Dichos betacuerpos, como se muestra en el presente documento, son eficaces en la unión a fosfatidilserina en placas y expuestos en superficies celulares. Sin embargo, se proporcionan otros medios de preparación de betacuerpos dimerizados y multimerizados, tales como nanopartículas, liposomas y otros armazones moleculares.

D2. Regiones Fc

La región Fc se conectará, ligará o conjugará con la proteína o polipéptido, receptor, ligando o péptido de unión a fosfatidilserina de tal manera que la actividad deseada del receptorcuerpo resultante no se destruya sustancialmente por la conexión con la región Fc. Puede emplearse cualquiera de las tecnologías de conjugación o ligamiento conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, las descritas en la sección pertinente del presente documento. Si se desea, pueden crearse proteínas de fusión usando técnicas de biología molecular, que ahora son una práctica convencional para los expertos habituales en la técnica, como de nuevo se ilustra en el presente documento. Por tanto, el receptorcuerpo puede fabricarse como un conjugado químico o como una proteína de fusión.

Dentro de las cadenas pesadas de una inmunoglobulina, los dominios amino terminales son los dominios variables (V_H). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera funcionan conjuntamente en la unión antigénica. En las cadenas pesadas, los dominios variables están seguidos por tres dominios constantes: C_H1 , C_H2 y el extremo carboxilo C_H3 . En determinadas realizaciones, hay un cuarto dominio constante, C_H4 . Un corto tramo, el interruptor, conecta las regiones variable y constante de cadena pesada. La bisagra conecta C_H2 y C_H3 (el fragmento Fc) con el resto del anticuerpo (los fragmentos Fab).

La naturaleza de la región constante determina diversos mecanismos de acción distintos de la unión antigénica. Los anticuerpos se dividen en cinco clases principales, IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, en función de la estructura de la región constante y función inmunitaria. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan μ , γ , α , δ y ϵ y respectivamente.

A la luz de las funciones efectoras proporcionadas por las regiones Fc (Bruggemann *et al.*, 1987; Riechmann *et al.*, 1988; Clark, 1997; Padlan, 1994; cada uno de estos documentos específicamente incorporado en el presente

documento por referencia), las regiones Fc actualmente preferidas son la IgG1 (γ 1) humana y la IgG3 (γ 3) humana para su uso clínico y la IgG2a (γ 2a) de ratón y la IgG2b (γ 2b) de ratón para ensayos preclínicos en ratones. Se piensa que la γ 2 es silenciosa y por tanto no debe seleccionarse para proporcionar funciones efectoras, aunque sigue siendo una proteína humana útil para su uso como un dominio de dimerización. Aunque seleccionada para las funciones efectoras, la parte Fc de las inmunoglobulinas también contribuye a prolongar la semivida, que puede resultar de la reabsorción activa de los anticuerpos en los riñones.

Aunque la expresión recombinante de las regiones Fc y de las construcciones de unión es conveniente, dichos fragmentos también pueden obtenerse por proteólisis de toda la inmunoglobulina, preferentemente por la tiorotasa no específica, papaína. La digestión con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados "fragmentos Fab", cada uno de ellos con un solo sitio de unión a antígeno y el "fragmento Fc" residual.

La papaína debe activarse primero reduciendo el grupo sulfhidrilo en el sitio activo con cisteína, 2-mercaptoetanol o ditioneitol. Los metales pesados en la enzima de reserva deben retirarse por quelación con EDTA (2 mM) para garantizar una actividad enzimática máxima. La enzima y el sustrato normalmente se mezclan juntas en la proporción de 1:100 por peso. Después de la incubación, la reacción puede detenerse por alquilación irreversible del grupo tiorotasa con yodoacetamina o simplemente por diálisis. La finalización de la digestión debe monitorizarse con SDS-PAGE y las diversas fracciones separarse mediante cromatografía de intercambio iónico o con proteína A-Sefarosa.

En determinadas realizaciones, pueden usarse dos fragmentos de Fc, preferentemente dos fragmentos de Fc humanos. En dichos aspectos, pueden combinarse dos proteínas, receptores o ligandos de unión con los dos fragmentos Fc para preparar otro tipo de receptorcuerpo divalente. Los fragmentos Fc humanos se preferirán para fabricar receptorcuerpos para la administración en seres humanos. De hecho, esto es una ventaja de la invención, ya que se produce una construcción terapéutica completamente humana. Por tanto, las construcciones Fc- β 2GPI incluyen agentes terapéuticos de betacuerpos completamente humanos.

D3. Otras construcciones y transportadores

Aunque el ligamiento de una región Fc a una proteína o polipéptido de unión a fosfatidilserina es la realización preferida de la invención del receptorcuerpo, las proteínas de unión a fosfatidilserina también pueden ligarse a transportadores inertes para conferir longevidad a las moléculas biológicamente activas. Como tal, la presente invención proporciona adicionalmente construcciones que comprenden al menos una primera proteína de unión a aminofosfolípido, incluyendo β 2GPI, conectada operativamente a al menos un primer transportador inerte.

Como se sabe en la técnica, las proteínas transportadoras pueden usarse para aumentar la semivida biológica, y son proteínas ejemplares las albúminas y globulinas, tales como neutravidina y estreptavidina. También pueden usarse transportadores no proteicos para aumentar la semivida biológica, tales como polímeros naturales o sintéticos, incluyendo polisacáridos y PEG. Cualquier transportador inerte de este tipo puede conectarse a cualquiera de las proteínas de unión a fosfatidilserina descritas en el presente documento.

Otros aspectos de la presente invención se refieren a composiciones de dímeros de β 2GPI preparados por medios que no sean el uso de una región Fc, y diversos métodos de uso. Particularmente, la invención proporciona métodos de tratamiento del cáncer y métodos para tratamiento de infecciones víricas, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un dímero de β 2GPI.

Otros aspectos más de la invención son los liposomas que comprenden polipéptidos β 2GPI, tanto en forma dimérica como no, y que incluyen polipéptidos β 2GPI distintos de los que se conectan con una región Fc. Como tal, la invención se refiere a un sistema de liberación de fármaco basado en una nanopartícula, liposoma, transportador de lípidos, complejo, mezcla, agregado multimolecular de estructura supramolecular o en lípido que comprende al menos un primer polipéptido β 2GPI. El polipéptido β 2GPI puede ser un dímero, pero no es preciso que lo sea. El polipéptido β 2GPI puede estar, o no, conectado a un agente terapéutico adicional. Dichos liposomas serán preferentemente liposomas furtivos y pueden contener un agente terapéutico en el núcleo del liposoma.

Otros aspectos adicionales de la presente invención se refieren a composiciones de polipéptidos β 2GPI (distintos de los polipéptidos β 2GPI conectados a una región Fc) en las que el polipéptido β 2GPI está conectado operativamente a al menos un primer agente terapéutico, y a diversos métodos de uso. Se prefieren particularmente composiciones en las que un polipéptido β 2GPI está conectado operativamente a al menos una primera citocina, tal como TNF α , IL-2 o IFN α . En determinadas realizaciones, el polipéptido β 2GPI será un dímero y un polipéptido β 2GPI dimérico estará conectado operativamente a al menos un primer agente terapéutico, tal como una citocina. Cualquiera de dichas construcciones o conjugados de citocina - β 2GPI se contemplan particularmente para su uso en el tratamiento de enfermedades, incluyendo infecciones víricas.

Por tanto, adicionalmente la invención proporciona métodos de tratamiento del cáncer y métodos de tratamiento de infecciones víricas, que comprende administrar a un animal que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción que comprende un polipéptido β 2GPI conectado operativamente a al menos una primera citocina, preferentemente a TNF α , IL-2 o IFN α . El polipéptido β 2GPI puede ser un polipéptido β 2GPI dimérico.

D4. Conjugados de Agentes Adicionales

Las construcciones y receptorcuerpos de la invención también pueden usarse para suministrar agentes terapéuticos conectados con dianas específicas, tales como el sistema vascular tumoral e intratumoral, células tumorales, células infectadas con virus y partículas víricas. Aunque no refiriéndose a construcciones con regiones Fc, cada una de las Patentes de Estados Unidos nº 6.312.694, 6.783.760 y 6.818.213 está identificada específicamente por sus enseñanzas generales con respecto a proteínas de unión a aminofosfolípidos conectadas con agentes terapéuticos. Al igual que las construcciones y receptorcuerpos de la presente invención que también pueden usarse en terapia antivírica segura y eficaz, estas construcciones también pueden ligarse ventajosamente con una serie de agentes antivíricos conocidos.

En estos aspectos de la invención, cualquier construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención puede usarse para preparar un conjugado. Los agentes para su uso en dichos conjugados incluyen preferentemente un agente anticelular o citotóxico, una citocina, quimiocina, un inhibidor de ATPasa de tipo V, inhibidor de la síntesis de proteínas, agente quimioterapéutico, agente antiangiogénico, agente inductor de apoptosis, fármaco antitubulina, radioisótopo, agente coagulante o antivírico. En los conjugados antivíricos, no hay ninguna necesidad de usar un segundo agente antivírico como el agente conectado.

E1. Agentes anticelulares y citotóxicos

Para determinadas aplicaciones, los agentes terapéuticos serán agentes citotóxicos o farmacológicos, particularmente citotóxicos, citoestáticos o, de otra manera, agentes anticelulares que tienen la capacidad de destruir o suprimir el crecimiento o la división celular de las células, particularmente células endoteliales tumorales, células tumorales o células infectadas con virus.

Los agentes anticelulares ejemplares incluyen agentes terapéuticos, así como citotoxinas. Los agentes quimioterapéuticos que pueden usarse incluyen: hormonas, tales como esteroides; antimetabolitos, tales como citosina arabinósido, fluorouracilo, metotrexato o aminopterina; antraciclinas; mitomicina C; alcaloides de la vinca; democolcina; etopósido, mitramicina; agentes alquilantes antitumorales, tales como clorambucilo o melfalán. Otras realizaciones pueden incluir agentes tales como citocinas. Básicamente puede usarse cualquier agente anticelular siempre que pueda conjugarse satisfactoriamente con una construcción de una manera que permita su direccionamiento, internalización, liberación y/o presentación a los componentes sanguíneos en el sitio de las células diana, tales como células endoteliales.

Puede haber circunstancias, tales como cuando el antígeno diana no se internaliza mediante una ruta de acuerdo con una intoxicación eficaz por el compuesto tóxico, en la que se deseará dirigir agentes quimioterapéuticos, tales como fármacos antitumorales, citocinas, antimetabolitos, agentes alquilantes, hormonas y similares. Diversos agentes quimioterapéuticos y otros agentes farmacológicos se han conjugado ahora satisfactoriamente y demuestran que funcionan desde un punto de vista farmacológico, incluyendo doxorubicina, daunomicina, metotrexato, vinblastina, neocarcinostatina, macromicina, trenimón y α -amanitina.

En otras circunstancias, cualquiera de los posibles efectos secundarios de la terapia basada en citotoxinas puede eliminarse mediante el uso de inhibidores de la síntesis de ADN, tales como daunorrubicina, doxorubicina, adriamicina y similares. Estos agentes son por tanto ejemplos preferidos de agentes anticelulares para su uso en determinados aspectos de la presente invención. En términos de agentes citoestáticos, dichos compuestos generalmente alteran el ciclo celular natural de una célula diana, preferentemente de tal manera que la célula se elimina del ciclo celular.

Se conoce una gran diversidad de agentes citotóxicos que pueden conjugarse. Como ejemplos se incluyen numerosas toxinas obtenidas de plantas, hongos o bacterias que, como ejemplo, incluyen diversas toxinas de cadena A, particularmente cadena A de ricina; proteínas inactivadoras de ribosomas, tales como saporina o gelonina; α -sarcina; aspergilina; restrictocina; ribonucleasas, tal como ribonucleasa placentaria; toxina diftérica y exotoxina de *pseudomonas*, por nombrar sólo unas cuantas.

El libro de toxinas, muy conocido, de 1992 "Genetically Engineered Toxins", editado por Arthur E. Frankel, incluyendo el anexo, que incluye las secuencias primarias de aminoácidos de una gran cantidad de toxinas, se incorpora específicamente en el presente documento por referencia, con la finalidad de describir adicionalmente y permitir el uso de toxinas en construcciones diana.

De las toxinas, se prefiere el uso de las cadenas A de gelonina y ricina. El uso de la gelonina como la parte efectora o toxina de inmunocombinados que se unen a marcadores expresados, accesible para unirse, adsorberse o localizarse en vasos sanguíneos intratumorales de un tumor vascularizado se describe en la Patente de Estados Unidos nº 6.051.230, específicamente incorporada en el presente documento por referencia, y en la Patente de Estados Unidos nº 6.451.312, que se refiere particularmente a la gelonina ligada a VEGF como un agente diana.

Al igual que las cadenas A de ricina, un resto de toxina adicionalmente preferido es la cadena A de toxina que se ha tratado para modificar o retirar restos de hidratos de carbono, denominada cadena A desglucosilada (dgA). La cadena A de ricina desglucosilada se prefiere por su extrema fuerza, semivida más prolongada y porque es

económicamente fácil de fabricarla a un grado y a una escala clínicos.

Puede ser deseable desde un punto de vista farmacológico emplear la molécula más pequeña posible que sin embargo proporcione una respuesta biológica apropiada. Se puede desear por tanto emplear péptidos de cadena A más pequeños que proporcionen una respuesta anticelular adecuada. Para esta finalidad, se ha descubierto que la cadena A de ricina puede “truncarse” retirando 30 aminoácidos N terminales por Nagarasa (Sigma) y conservar aún una actividad de toxina adecuada. Se propone que, cuando se desee, esta cadena A truncada pueda emplearse en conjugados de acuerdo con la invención.

Como alternativa, se puede encontrar que la aplicación de la tecnología de ADN recombinante para el resto de la cadena A de toxina proporcione beneficios adicionales de acuerdo con la invención. Dado que se ha conseguido la clonación y expresión de la cadena A de ricina biológicamente activa, ahora es posible identificar y preparar péptidos más pequeños, o de otra manera variantes, que no obstante presenten una actividad de toxina apropiada. Además, el hecho de que la cadena A de ricina se haya clonado ahora, permite la aplicación de la mutagénesis dirigida, a través de la cual se pueden preparar y explorar fácilmente péptidos derivados de cadena A y obtener restos útiles adicionales para su uso junto con la presente invención.

E2. Citocinas

Las citocinas y quimiocinas son ejemplos particulares de agentes para la unión a una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la presente invención. Pueden usarse diversas citocinas, incluyendo IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-13, TGF- β , M-CSF, G-CSF, TNF β , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, IFN- α , IFN- β . Las citocinas más preferidas incluyen IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), factor BB de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) y proteína C reactiva (CRP) y similares. Los ejemplos particularmente preferidos son TNF α , inductores de TNF α , IL-2, IL-12, IFN- β , IFN- γ y LEC.

El TNF α aumenta la permeabilidad vascular. Este agente se contempla para la conexión a una construcción receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, particularmente cuando el conjugado resultante se usa en terapia de combinación para el tratamiento del cáncer. La construcción suministrará el TNF α unido al entorno tumoral, y la permeabilidad vascular potenciada causada en el tumor facilitará la penetración de un segundo agente anticanceroso en el tumor, amplificando de este modo el efecto antitumoral global.

La IL-12, por ejemplo, puede unirse a una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo y usarse para redirigir defensas del hospedador para atacar los vasos tumorales. La quimiocina LEC (quimiocina expresada en el hígado, también conocida como NCC-4, HCC-4 o LMC) es otro componente preferido (Gioaerelli *et al.*, 2000). LEC es quimiotáctica para células dendríticas, monocitos, linfocitos T, células MK y neutrófilos y por lo tanto puede mejorar las respuestas antitumorales mediadas por el hospedador.

E3. Factores de coagulación

Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención puede ligarse a un componente que sea capaz de estimular directa o indirectamente la coagulación, para formar un coagulando. Las Patentes de Estados Unidos n° 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289 y 6.036.955 se identifican específicamente por referencia con el fin de describir adicionalmente la conexión operativa de coagulantes para formar coagulandos.

Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención puede ligarse directamente al coagulante o factor de coagulación, o puede ligarse a una segunda región de unión que se une y después libera el coagulante o factor de coagulación. Como se usa en el presente documento, cada uno de los términos “coagulante” y “factor de coagulación” se usa para referirse a un componente que sea capaz de estimular directa o indirectamente la coagulación en condiciones apropiadas, preferentemente cuando se proporciona en un entorno *in vivo* específico, tal como el sistema vascular tumoral.

Los factores de coagulación preferidos son composiciones de Factor Tisular, tales como moléculas de TF truncado (tTF), moléculas de TF diméricas, multiméricas y mutantes. “TF truncado” (tTF) se refiere a construcciones de TF cuya unión a membranas se vuelve deficitaria por la retirada de secuencias de aminoácidos suficientes para efectuar este cambio correctamente. Una “cantidad suficiente” en este contexto es una cantidad de secuencias de aminoácidos transmembrana originalmente suficiente para introducir la molécula de TF en la membrana, o de otra manera, mediar en la unión funcional de la membrana de la proteína TF. Por tanto, la retirada de dicha “cantidad suficiente de la secuencia del tramo transmembrana” crea una proteína o un polipéptido del Factor Tisular truncado con déficit en cuanto a la capacidad de unión a membranas fosfolípicas, de tal manera que la proteína es sustancialmente una proteína soluble que no se une significativamente a membranas fosfolípicas. El TF truncado por tanto no convierte sustancialmente el Factor VII a Factor VIIa en un ensayo de TF estándar, e incluso conserva la actividad denominada catalítica, incluyendo la activación del Factor X en presencia del Factor VIIA.

Las Patentes de Estados Unidos n° 5.504.067, 6.156.321, 6.132.729 y 6.132.730 se identifican específicamente con la finalidad de describir adicionalmente dichas proteínas de Factor Tisular truncado. Preferentemente, los Factores Tisulares para su uso en estos aspectos de la presente invención generalmente carecerán de las regiones transmembrana y citosólicas (aminoácidos 220-263) de la proteína. Sin embargo, no existe la necesidad de que las

moléculas de TF truncado se limiten a moléculas de una longitud exacta de 219 aminoácidos.

- Las composiciones de Factor Tisular también pueden ser útiles como dímeros. Cualquiera de las construcciones de Factor Tisular truncado, mutado u otras pueden prepararse de una forma dimérica para su uso en la presente invención. Como sabrán los expertos habituales en la técnica, dichos dímeros de TF pueden prepararse empleando técnicas convencionales de biología molecular y expresión recombinante, en las cuales dos regiones codificantes se preparan en fase y se expresan a partir de un vector de expresión. Del mismo modo, pueden emplearse diversas tecnologías de conjugación química junto con la preparación de dímeros de TF. Los monómeros de TF individuales pueden derivatizarse antes de la conjugación. Los expertos en la técnica conocerán fácilmente todas estas técnicas.
- Si se desea, los dímeros o multímeros de Factor Tisular pueden unirse mediante un enlace biológicamente liberable, tal como un enlazador o una secuencia de aminoácidos selectivamente escindible. Por ejemplo, se contemplan enlazadores peptídicos que incluyen un sitio de escisión para una enzima localizada o activa preferentemente dentro de un entorno tumoral. Formas ejemplares de dichos enlazadores peptídicos son aquellas que se escinden mediante uroquinasa, plasquina, trombina, Factor IXa, Factor Xa, o una metaloproteinasa, tal como colagenasa, gelatinasa o estromelisin.
- En determinadas realizaciones, los dímeros del Factor Tisular pueden comprender adicionalmente un resto de inserción de membrana hidrófobo oculto, para estimular más tarde la asociación funcional del factor tisular con la membrana fosfolipídica, pero solo en determinadas condiciones definidas. Como se describe en el contexto de Factores Tisulares truncados, las secuencias hidrófobas de asociación a membrana son generalmente tramos de aminoácidos que promueven la asociación con el entorno fosfolipídico debido a su naturaleza hidrófoba. Del mismo modo pueden usarse ácidos grasos para proporcionar el resto de inserción de membrana potencial.
- Dichas secuencias de inserción a membrana pueden localizarse bien en el extremo N o en el extremo C de la molécula TF, o generalmente anexarse en cualquier otro punto de la molécula siempre que su unión a la misma no impida las propiedades funcionales de la construcción TF. La intención del resto de inserción oculto es que permanezca no funcional hasta que la construcción de TF se localice dentro del entorno tumoral, y permita que el anexo hidrófobo se haga accesible e incluso adicionalmente promueva la asociación física con la membrana. De nuevo, se contempla que los enlaces biológicamente liberables y las secuencias selectivamente escindibles sean particularmente útiles en este sentido, escindiéndose el enlace o la secuencia o, de otra manera, modificándose después de la localización dentro del entorno tumoral y la exposición a enzimas u otras moléculas bioactivas particulares.
- En otras realizaciones, las construcciones de tTF pueden ser multiméricas o poliméricas. En este contexto una "construcción polimérica contiene tres o más construcciones de Factor Tisular. Una "construcción multimérica o polimérica de TF" es una construcción que comprende una primera molécula o derivado de TF conectada operativamente a al menos una segunda y una tercera molécula o derivado de TF. Los multímeros pueden comprender entre aproximadamente 3 y aproximadamente 20 de dichas moléculas de TF. Las unidades de TF individuales dentro de los multímeros o polímeros también pueden ligarse mediante enlazadores peptídicos selectivamente escindibles u otros enlaces biológicos liberables según se desee. De nuevo, al igual que con los dímeros de TF indicados anteriormente, las construcciones pueden prepararse fácilmente usando manipulación recombinante y expresión o usando química sintética convencional.
- Incluso construcciones de TF adicionales útiles en el contexto de la presente invención son aquellas mutantes deficientes en cuanto a la capacidad de activar el Factor VII. Dichos "mutantes de activación de Factor VII" se definen generalmente en el presente documento como mutantes de TF que se unen al Factor VII/VIIa funcional, activan proteolíticamente el Factor X, pero sustancialmente carecen de la capacidad de activar proteolíticamente el Factor VII. Por consiguiente, dichas construcciones son mutantes de TF que carecen de la actividad de activación del Factor VII.
- La capacidad de dichos mutantes de activación del Factor VII que funcionan promoviendo la coagulación específica de tumor, se basa en su liberación específica del sistema vascular tumoral, y la presencia del Factor VIIa a bajos niveles en plasma. Después de la administración de dicho conjugado mutante de activación del Factor VII, el mutante se localizará dentro del sistema vascular de un tumor vascularizado. Antes de la localización, el mutante de TF debería ser generalmente incapaz de promover la coagulación en cualquier otro lugar del organismo, basándose en su incapacidad de convertir el Factor VII a Factor VIIa. Sin embargo, después de la localización y acumulación dentro de la región tumoral, el mutante encontrará después suficiente Factor VIIa a partir del plasma para iniciar la ruta de coagulación extrínseca, que conduce a trombosis específica de tumor. El Factor VIIa exógeno también podría administrarse al paciente.
- Pueden prepararse uno cualquiera o más de una diversidad de mutantes de activación del Factor VII y usarse junto con la presente invención. Hay una cantidad significativa de conocimiento científico con respecto a los sitios de reconocimiento de la molécula de TF para el Factor VII/VIIa. Por tanto, se entenderá que la región de activación del Factor VII generalmente se extiende entre aproximadamente el aminoácido 157 y aproximadamente el aminoácido 167 de la molécula de TF. Sin embargo, se contempla que los restos fuera de esta región también pueden demostrar ser relevantes para la actividad activadora del Factor VII, y se puede considerar por lo tanto introducir mutaciones en

cualquiera de uno o más de los restos generalmente localizados entre el aminoácido 106 y aproximadamente el aminoácido 209 de la secuencia TF (documentos WO 94/07515; WO 94/28017).

5 Como se detalla en las Patentes de Estados Unidos nº 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289 y 6.036.955, pueden usarse diversos factores de coagulación distintos junto con la presente invención, como se ilustra mediante los agentes indicados más adelante. La trombina, el Factor V/Va y derivados, el Factor VIII/VIIIa y derivados, el Factor IX/IXa y derivados, el Factor X/Xa y derivados, el Factor XI/Xia y derivados, el Factor VII/XIIa y derivados, el Factor XIII/XIIIa y derivados, el activador del Factor X y el activador del Factor V pueden usarse en la presente invención.

10 El activador del Factor X del veneno de la víbora de Russell se contempla para su uso en esta invención. También se han producido anticuerpos monoclonales específicos para el activador del Factor X presentes en el veneno de la víbora de Russell y podrían usarse para liberar específicamente el agente como parte de un ligando de unión biespecífico.

15 El tromboxano A₂ se forma a partir de endoperóxidos mediante acciones secuenciales de las enzimas ciclooxigenasa y tromboxano sintetasa en microsomas plaquetarios. El tromboxano A₂ se genera fácilmente por plaquetas y es un fuerte vasoconstrictor, gracias a su capacidad de producir agregación plaquetaria. Tanto el tromboxano A₂ como sus análogos activos se contemplan para su uso en la presente invención.

La tromboxano sintasa, y otras enzimas que sintetizan prostaglandinas activadoras de plaquetas, también pueden usarse como "coagulantes" en el presente contexto. Se conocen anticuerpos monoclonales contra, y su purificación por inmutofinidad de, la tromboxano sintasa; como el ADNc de la tromboxano sintasa humana.

20 La α2-antiplasmina, o inhibidor de α2-plasmina, es un inhibidor de proteinasa presente de manera natural en el plasma humano que actúa inhibiendo eficazmente la lisis de coágulos de fibrina inducida por el activador de plasminógeno. La α2-antiplasmina es un inhibidor particularmente fuerte, y se contempla para su uso en la presente invención.

25 Dado que se dispone de la secuencia de ADNc de la α2-antiplasmina, se prefiere la expresión recombinante y/o las proteínas de fusión. También se dispone de anticuerpos monoclonales contra la α2-antiplasmina y pueden usarse en las realizaciones de ligando de unión biespecífico de la invención. Estos anticuerpos pueden usarse para liberar la α2-antiplasmina exógena en el sitio diana o para almacenar α2-antiplasmina endógena y concentrarla dentro de la región diana.

E4. Fármacos antitubulina

30 Diversos fármacos ejercen sus efectos interfiriendo con la actividad de la tubulina. Dado que las funciones de la tubulina son esenciales para la mitosis y la viabilidad celular, determinados "fármacos antitubulina" son poderosos agentes quimioterapéuticos. El/los "fármaco(s) antitubulina", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente, fármaco, profármaco o combinación de los mismos que inhiba la mitosis celular, preferentemente inhibiendo directa o indirectamente las actividades de la tubulina necesarias para la mitosis celular, preferentemente la polimerización o despolimerización de la tubulina.

35 Algunos de los fármacos antitubulina más bien conocidos y actualmente preferidos para su uso con la presente invención son colchicina; taxanos, tal como taxol; alcaloides de la vinca, tales como vinblastina, vincristina y vindescina; y combrestatinas. Otros fármacos antitubulina adecuados son las citocalasinas (incluyendo B, J, E), dolastatina, auristatina PE, paclitaxel, ustiloxina D, rizoxina, 1069C85, colcemid, albendazol, azataxina y nocodazol.

40 Como se describe en las Patentes de Estados Unidos nº 5.892.069, 5.504.074 y 5.661.143, las combrestatinas son derivados de estradiol que generalmente inhiben la mitosis celular. Las combrestatinas ejemplares que pueden usarse junto con la invención incluyen las que se basan en combrestatina A, B y/o D y las descritas en las Patentes de Estados Unidos nº 5.892.069, 5.504.074 y 5.661.143. Las combrestatinas A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6, B-1, B-2, B-3 y B-4 son ejemplos de los tipos anteriores.

45 Las Patentes de Estados Unidos nº 5.569.786 y 5.409.953, se identifican con la finalidad de describir el aislamiento, la caracterización estructural y síntesis de cada una de las combrestatinas A-1, A2, A-3, B-1, B-2, B-3 y B-4 y formulaciones y métodos del uso de dichas combrestatinas para tratar el crecimiento neoplásico. Cualquiera de una o más de dichas combrestatinas puede usarse junto con la presente invención.

50 La combrestatina A-4, como se describe en las Patentes de Estados Unidos nº 5.892.069, 5.504.074, 5.661.143 y 4.996.237 también pueden usarse con el presente documento. La Patente de Estados Unidos nº 5.561.122 se identifica por describir profármacos de combrestatina A-4 adecuados, que se contemplan para su uso combinado con la presente invención.

55 La Patente de Estados Unidos nº 4.940.726, describe particularmente lactonas macrocíclicas denominadas combrestatina D-1 y 'Combrestatina D-2', cada una de las cuales puede usarse en combinación con las composiciones y métodos de la presente invención. La Patente de Estados Unidos nº 5.430.062 se refiere a derivados de estilbeno y análogos de combrestatina con actividad anticancerosa que pueden usarse en

combinación con la presente invención.

E5. Agentes antiangiogénicos

Los agentes antiangiogénicos son útiles para la conexión a una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención. Muchos agentes anticancerosos tienen un efecto antiangiogénico como parte de su mecanismo de acción. Cualquiera de uno o más de dichos agentes descritos para su uso en terapias de combinación, incluyendo los que se indican en la **Tabla E**, pueden conjugarse con una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, como se describe en el presente documento. Se han descubierto, diseñado o seleccionado determinados otros agentes, que tienen un efecto antiangiogénico como un mecanismo de acción primaria. Los ejemplos de dichos agentes se describen más adelante, pudiendo usarse cualquiera de ellos para preparar un conjugado o usarse por separado en terapia de combinación con la invención.

Ahora se conocen numerosos inhibidores de tirosina quinasa útiles para el tratamiento de la angiogénesis, como se manifiesta en diversas patologías. Estos incluyen, por ejemplo, las 4-aminopirrol[2,3-d]pirimidinas de la Patente de Estados Unidos nº 5.639.757, que también pueden usarse en combinación con la presente invención. Otros ejemplos de moléculas orgánicas capaces de modular la transducción de señal de la tirosina quinasa mediante el receptor VEGFR2 son los compuestos de quinazolina y las composiciones de la Patente de Estados Unidos nº 5.792.771, que se identifica con la finalidad de describir combinaciones adicionales para su uso con la presente invención en el tratamiento de enfermedades angiogénicas.

Los compuestos de otras clases químicas también se ha mostrado que inhiben la angiogénesis y que pueden usarse en combinación con la presente invención. Por ejemplo, los esteroides tales como los esteroides angioestáticos 4,9(11) y esteroides C21 oxigenados, como se describe en la Patente de Estados Unidos nº 5.972.922, pueden emplearse en terapia combinada. Las Patentes de Estados Unidos nº 5.712.291 y 5.593.990 describen talidomida y compuestos, precursores análogos, metabolitos y productos de hidrólisis relacionados, que también pueden usarse en combinación con presente invención para inhibir la angiogénesis. Los compuestos de las Patentes de Estados Unidos nº 5.721.291 y 5.593.990 pueden administrarse por vía oral. En la **Tabla B** se indican otros agentes antiangiogénicos ejemplares que son útiles junto con terapia combinada. Cada uno de los agentes indicados en el presente documento es ejemplar y no significa que sea limitante.

TABLA B

Inhibidores y reguladores negativos de la angiogénesis

Sustancias	Referencias
Angiostatina	O'Reilly <i>et al.</i> , 1994
Endostatina	O'Reilly <i>et al.</i> , 1997
Fragmento de prolactina de 16 kDa	Ferrara <i>et al.</i> , 1991; Clapp <i>et al.</i> , 1993; D'Angelo <i>et al.</i> , 1995; Lee <i>et al.</i> , 1998
Péptidos de laminina	Kleinman <i>et al.</i> , 1993; Yamamura <i>et al.</i> , 1993; Iwamoto <i>et al.</i> , 1996; Tryggvason, 1993
Péptidos de fibronectina	Grant <i>et al.</i> , 1998; Sheu <i>et al.</i> , 1997
Inhibidores de metaloproteinasa tisular (TIMP 1, 2, 3,4)	Sang, 1998
Inhibidores del activador de plasminógeno (PAI-1, -2)	Soff <i>et al.</i> , 1995
Factor α de necrosis tumoral (altas dosis <i>in vitro</i>)	Frater-Schrodere <i>et al.</i> , 1987
TGF- β 1	RayChadhury y D'Amore, 1991; Tada <i>et al.</i> , 1994
Interferones (IFN- α , - β , γ)	Moore <i>et al.</i> , 1998; Lingen <i>et al.</i> , 1998
Quimiocinas ELR- CXC: IL-12; SDF-1; MIG; factor 4 plaquetario (PF-4); IP-10	Moore <i>et al.</i> , 1998; Hiscox y Jiang, 1997; Coughlin <i>et al.</i> , 1998; Tanaka <i>et al.</i> , 1997
Trombospondina (TSP)	Good <i>et al.</i> , 1990; Frazier, 1991; Bornstein, 1992; Tolsma <i>et al.</i> , 1993; Sheibani y Frazier, 1995; Volpert <i>et al.</i> , 1998

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

- 5 Determinados componentes preferidos para su uso en la inhibición de la angiogénesis son angiostatina, endostatina, vasculostatina, canstatina y maspina. La proteína denominada "angiostatina" se desvela en las Patentes de Estados Unidos 5.776.704; 5.639.725 y 5.733.876, cada una de ellas incorporada en el presente documento por referencia.
- 5 La angiostatina es una proteína que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 38 kD y aproximadamente 45 kD, determinado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras, que contiene aproximadamente de 1 a 4 regiones Kringle de una molécula de plasminógeno. Generalmente la angiostatina tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la de un fragmento de plasminógeno murino que comienza en el aminoácido número 98 de una molécula de plasminógeno murino intacta.
- 10 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 número de aminoácido 97 o 99 de una secuencia de aminoácidos de plasminógeno humano intacta. Además, el plasminógeno humano puede usarse ya que tiene actividad antiangiogénica similar, como se muestra en un modelo
- 15 de tumor de ratón.
- Determinadas terapias antiangiogénicas ya se han mostrado que causan regresiones tumorales y la angiostatina es uno de estos agentes. La endostatina, un fragmento COOH-terminal de 20 kDa de colágeno XVIII, el polisacárido bacteriano CM101 y el anticuerpo LM609 también tienen actividad antiangiogénica. Sin embargo, a la luz de sus
- 20 otras propiedades, se denominan terapias antiavasculares o toxinas de vasos tumorales, ya que no solo inhiben la angiogénesis sino también inician la destrucción de vasos tumorales a través de gran parte de mecanismos indefinidos.
- La angiostatina y la endostatina se han convertido en el centro de intensos estudios, ya que son los primeros inhibidores de la angiogénesis que han demostrado la capacidad de inhibir no solo el crecimiento tumoral sino también causar regresiones tumorales en ratones. Hay múltiples proteasas que se ha observado que producen
- 25 angiostatina a partir de plasminógeno incluyendo elastasa, metaloelastasa de macrófagos (MME), matrilisina (MMP-7) y gelatinasa B de 92 kDa/colagenasa de tipo IV (MMP-9).
- La MME puede producir angiostatina a partir de plasminógeno en tumores y el factor de estimulación de colonias de

granulocitos y macrófagos (GM-CSF) regula positivamente la expresión de MME por macrófagos induciendo la producción de angiostatina. La función de la MME en la generación de la angiostatina está confirmada por el hallazgo de que, en efecto, la MME se expresa en muestras clínicas de carcinomas hepatocelulares de pacientes. Otra proteasa que se piensa que puede producir angiostatina es la estromelina-1 (MMP-3). Se ha observado que la MMP-3 produce fragmentos similares a los de la angiostatina a partir de plasminógeno *in vitro*. El mecanismo de acción de la angiostatina es actualmente incierto, se crea la hipótesis de que se une a un receptor no identificado de la superficie celular o a células endoteliales induciendo que las células endoteliales sufran muerte celular programada o parada mitótica.

La endostatina parece ser un agente antiangiogénesis y antitumoral incluso más poderoso aunque su biología es menos clara. La endostatina es eficaz causando regresiones en diversos modelos de tumores en ratones. Los tumores no desarrollan resistencia a endostatina y, después de múltiples ciclos de tratamiento, los tumores entran en un estado inactivo durante el cual no aumentan de volumen. En este estado inactivo, el porcentaje de células tumorales que sufre apoptosis aumentó, produciendo una población que conserva esencialmente el mismo tamaño. Se piensa que la endostatina se une a un receptor de superficie de células endoteliales no identificado que actúa como mediador en este efecto.

La Patente de Estados Unidos nº 5.854.205, de Folkman y O'Reilly, se refiere a la endostatina y a su uso como un inhibidor de proliferación y angiogénesis de células endoteliales. La proteína endostatina corresponde a un fragmento C terminal de colágeno de tipo XVIII y la proteína puede aislarse de diversas fuentes. La Patente de Estados Unidos nº 5.854.205 también enseña que la endostatina puede tener una secuencia de aminoácidos de un fragmento de colágeno de tipo XVIII, de un colágeno de tipo XV, o de una esterasa gástrica BOVMPE 1. También se describen combinaciones de endostatina con otras proteínas antiangiogénicas, particularmente angiostatina, en la Patente de Estados Unidos nº 5.854.205, de tal manera que las composiciones combinadas pueden disminuir la masa de un tumor dependiente de angiogénesis.

CM101 es un polisacárido bacteriano que se ha caracterizado bien en cuanto a su capacidad de inducir inflamación neovascular en tumores. CM101 se une y se entrecruza con receptores expresados en endotelio desdiferenciado que estimula la activación del sistema del complemento. También inicia una respuesta inflamatoria impulsada por citocinas que se dirige selectivamente al tumor. Este es un agente antipatoangiogénico exclusivo que regula por disminución la expresión de VEGF y sus receptores. CM101 está actualmente en ensayos clínicos como un fármaco contra el cáncer, y puede usarse en combinación con la presente invención.

La trombospondina (TSP-1) y el factor plaquetario 4 (PF4) también pueden usarse en la presente invención. Ambos son inhibidores de la angiogénesis que se asocian con heparina y se encuentran en gránulos α plaquetarios. La TSP-1 es una glucoproteína multidominio grande de 450 kDa que es un constituyente de la matriz extracelular. La TSP-1 se une a muchas de las moléculas de proteoglucano encontradas en la matriz extracelular incluyendo las HSPG, fibronectina, laminina y diferentes tipos de colágeno. La TSP-1 inhibe la migración y proliferación de células endoteliales *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*. La TSP-1 también suprime el fenotipo maligno y la tumorigénesis de células endoteliales transformadas. Se ha demostrado que el gen supresor tumoral p53 regula directamente la expresión de TSP-1 de tal manera que, la pérdida de actividad de p53 causa una reducción drástica en la producción de TSP-1 y un aumento simultáneo en la angiogénesis iniciada por tumor.

El PF4 es una proteína de 70aa que es un miembro de la familia de quimiocinas CXC ELR que puede inhibir fuertemente la proliferación de células endoteliales *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*. PF4 se administra por vía intratumoral o se suministra mediante un vector adenovírico que puede causar una inhibición del crecimiento tumoral.

Los interferones y los inhibidores de metaloproteinasas son dos clases distintas de inhibidores angiogénicos de origen natural que pueden suministrarse de acuerdo con la presente invención. La actividad antiendotelial de los interferones se conoce desde el inicio del año 1980, sin embargo, el mecanismo de inhibición aún no se conoce. Se sabe que pueden inhibir la migración de células endoteliales y que tienen alguna actividad antiangiogénica *in vivo* que está posiblemente mediada por su capacidad de inhibir la producción de promotores angiogénicos por células tumorales. Los tumores vasculares son, en particular, sensibles a interferón, por ejemplo, la proliferación de hemangiomas puede tratarse satisfactoriamente con IFN α .

Los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) son una familia de inhibidores de origen natural de metaloproteasas de la matriz (MMP) que también pueden inhibir la angiogénesis y que pueden usarse en los protocolos de tratamiento de la presente invención. Las MMP desempeñan un papel clave en el proceso angiogénico ya que degradan la matriz a través de lo cual las células endoteliales y los fibroblastos migran cuando se extiende o remodela la red vascular. De hecho, se ha observado que, un miembro de las MMP, la MMP-2, se asocia con endotelio activado a través de la integrina $\alpha\beta 3$ supuestamente para esta finalidad. Si esta interacción se altera por un fragmento de MMP-2, entonces la angiogénesis se regula por disminución y se inhibe el crecimiento en los tumores.

Existen diversos agentes farmacológicos que inhiben la angiogénesis, pudiendo usarse uno cualquiera o más de los mismos como parte de la presente invención. Estos incluyen AGM-1470/TNP-470, talidomida y carboxiamidotriazol

(CAI). En 1990 se descubrió que la fumagilina era un fuerte inhibidor de la angiogénesis y desde entonces se han desarrollado los análogos sintéticos de la fumagilina, AGM-1470 y TNP-470. Estos dos fármacos inhiben la proliferación de las células endoteliales *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*. TNP-470 se ha estudiado exhaustivamente en ensayos clínicos en seres humanos con datos que sugieren que la administración prolongada es óptima.

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

10 El CAI es un inhibidor sintético de angiogénesis de bajo peso molecular que actúa como un bloqueador del canal de calcio que impide la reorganización de la actina, la migración y propagación de las células endoteliales en colágeno IV. CAI inhibe la neovascularización a concentraciones fisiológicas asequibles y los pacientes con cáncer lo toleran bien por vía oral. Ensayos clínicos con CAI han producido una estabilización de la enfermedad en el 49 % de los pacientes con cáncer que tienen enfermedad progresiva antes del tratamiento.

15 La cortisona en presencia de heparina o de fragmentos de heparina se demostró que inhibía el crecimiento tumoral en ratones bloqueando la proliferación celular endotelial. El mecanismo implicado en el efecto inhibidor aditivo del esteroide y heparina es incierto aunque se piensa que la heparina puede aumentar la captación del esteroide mediante células endoteliales. Se ha observado que la mezcla aumenta la disolución de la membrana basal por debajo de los capilares recién formados y esto es también una posible explicación del efecto angiostático aditivo. Los conjugados de heparina-cortisol también tienen fuerte actividad con efectos angiostáticos y antitumorales *in vivo*.

20 Usando los métodos de direccionamiento tumoral de la presente invención se pueden suministrar a los tumores otros inhibidores de angiogénesis específicos. Estos incluyen, pero sin limitación, factor antiinvasivo, ácido retinoico y paclitaxel (Patente de Estados Unidos nº 5.716.981); AGM-1470 (Ingber *et al.*, 1990); extracto de cartílago de tiburón (Patente de Estados Unidos nº 5.618.925); poliamida aniónica u oligómeros de poliurea (Patente de Estados Unidos nº 5.593.664); derivados de oxindol (Patente de Estados Unidos nº 5.576.330); derivados de estradiol (Patente de Estados Unidos nº 5.504.074); y derivados de tiazolopirimidina (Patente de Estados Unidos nº 5.599.813) también se contemplan para su uso como composiciones antiangiogénicas para los usos combinados de la presente invención.

25 Las composiciones que comprenden un antagonista de una $\alpha_v\beta_3$ integrina también pueden usarse para inhibir la angiogénesis como parte de la presente invención. Como se desvela en la Patente de Estados Unidos nº 5.766.591 los polipéptidos que contienen RGD y sales de los mismos, incluyendo polipéptidos cíclicos, son ejemplos adecuados de antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ integrina.

30 Como las angiopoyetinas son ligandos de Tie2, también puede usarse otros métodos de intervención terapéutica basados en la alteración de la señalización a través del receptor de Tie2 en combinación con las mismas. Por ejemplo, puede emplearse un receptor de Tie2 soluble capaz de bloquear la activación de Tie2 (Lin *et al.*, 1998a). Se ha observado que la administración de dicha construcción, usando terapia génica adenovírica recombinante, es eficaz en el tratamiento del cáncer y en la reducción de la metástasis (Lin *et al.*, 1998a).

35 Las angiopoyetinas, en común con los miembros de la familia del VEGF, son factores de crecimiento específicos del endotelio vascular (Davis y Yancopoulos, 1999; Holash *et al.*, 1999).

Las primeras angiopoyetinas descritas eran un activador o agonista del receptor de origen natural, la angiopoyetina 1 (Ang-1) y un antagonista del receptor de origen natural, la angiopoyetina 2 (Ang-2), actuando las dos mediante el receptor de tirosina quinasa de células endoteliales, Tie2.

40 También se han identificado dos nuevas angiopoyetinas, angiopoyetina-3 (ratón) y angiopoyetina-4 (ser humano) (Valenzuela *et al.*, 1999). La angiopoyetina 3 parece actuar como un antagonista (al igual que Ang-2), mientras que la angiopoyetina 4 parece actuar como un agonista (al igual que Ang-1) (Valenzuela *et al.*, 1999). También se clonó una proteína denominada angiopoyetina 3 de corazón humano y se describió que no tenía efectos mitogénicos sobre las células endoteliales (Kim *et al.*, 1999).

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

50 E6. Agentes inductores de apoptosis

La presente invención también puede usarse para suministrar agentes que inducen apoptosis en cualquier célula, incluyendo células tumorales, células endoteliales vasculares tumorales y células infectadas con virus. Muchos agentes anticancerosos tienen, como parte de su mecanismo de acción, un efecto inductor de apoptosis. Uno cualquiera o más de dichos agentes descritos para su uso en terapias de combinación, incluyendo los indicados en la **Tabla F**, también pueden conjugarse con una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, como se

55

describe en el presente documento. Se han descubierto, diseñado o seleccionado determinados agentes distintos que tienen un efecto inductor de apoptosis como un mecanismo primario. Los ejemplos de dichos agentes se describen más adelante, pudiendo usarse cualquiera de ellos para preparar un conjugado o usarse por separado en terapia de combinación con la invención.

- 5 Muchas formas de cáncer tienen informes de mutaciones en genes supresores tumorales, tales como p53. La inactivación de p53 produce una incapacidad de promover la apoptosis. Con esta capacidad, las células cancerosas progresan en tumorigénesis, en lugar de estar destinadas a la muerte celular. Por tanto, el suministro de supresores tumorales también se contempla para su uso en la presente invención para estimular la muerte celular. Los ejemplos de supresores tumorales incluyen, pero sin limitación, p53, genes de retinoblastoma (Rb), gen de tumor de Wilms (WT1), bax alfa, enzima y familia convertidora de interleucina-1b, gen de MEN-1, neurofibromatosis de tipo 1 (NF1), inhibidor p16 de cdk, gen del cáncer colorrectal (DCC), gen de la poliposis adenomatósica familiar (FAP), gen supresor tumoral múltiple (MTS-1), BRCA1 y BRCA2.

- 10 Para su uso se prefieren los genes de p53 (Patente de Estados Unidos nº 5.747.469; 5.677.178; y 5.756.455), Retinoblastoma, BRCA1 (Patentes de Estados Unidos nº 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 registro GenBank U93236) y de adenovirus E1A (Patente de Estados Unidos nº 5.776.743).

- 15 Otros oncogenes que inhiben la apoptosis o la muerte celular programada incluyen, sin limitación, bcr-abl, bcl-2 (distinto de bcl-1, ciclina D1; números de registro GenBank M14745, X06487; Patente de Estados Unidos nº 5.650.491; y 5.539.094) y miembros de la familia incluyendo Bcl-x1, Mc1-1, Bak, A1, A20. La sobreexpresión de bcl-2 se descubrió por primera vez en linfomas de linfocitos T. bcl-2 actúa como un oncogén uniéndose e inactivando Bax, una proteína en la ruta apoptótica. La inhibición de la función de bcl-2 impide la inactivación de Bax, y permite que continúe la ruta apoptótica. Por tanto, la inhibición de esta clase de oncogenes, por ejemplo, usando secuencias de nucleótidos antisentido, se contempla para su uso en la presente invención en aspectos en los que se desee la potenciación de la apoptosis (Patentes de Estados Unidos nº 5.650.491; 5.539.094; y 5.583.034).

- 20 Otras composiciones que pueden suministrarse a través de una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la presente invención incluyen genes que codifican el ligando que induce la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral denominado TRAIL, y el polipéptido TRAIL (Patente de Estados Unidos nº 5.763.223); la proteasa asociada a apoptosis de 24 kD de la Patente de Estados Unidos nº 5.605.826; el factor 1 asociado a Fas, FAF1 (Patente de Estados Unidos nº 5.750.653). También se contempla para su uso en estos aspectos de la presente invención el suministro de enzima convertidora de interleucina 1 β y miembros de la familia, que también se comunica que estimulan la apoptosis.

- 25 También pueden usarse compuestos tales como derivados de carbostirilo (Patentes de Estados Unidos nº 5.672.603; y 5.464.833); péptidos apogénicos ramificados (Patente de Estados Unidos nº 5.591.717); inhibidores de fosfotirosina y análogos de fosfotirosina no hidrolizables (Patentes de Estados Unidos nº 5.565.491; y 5.693.627); agonistas de receptores retinoideos RXR (Patente de Estados Unidos nº 5.399.586); e incluso antioxidantes (Patente de Estados Unidos nº 5.571.523). Los inhibidores de tirosina quinasa, tales como genisteína, también pueden relacionarse con los anticuerpos de la presente invención (como sostiene la Patente de Estados Unidos nº 5.587.459).

E7. Agentes antivíricos

- 30 Dado que PS y otros fosfolípidos aniónicos comienzan a exponerse en células infectadas con virus, una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención también puede ligarse con cualquiera de uno o más agentes antivíricos. Los ejemplos de agentes antivíricos para ligarse a una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo incluyen los indicados en la **Tabla G**. Dichos agentes antivíricos también pueden usarse por separado en las terapias de combinación antivíricas de la invención.

- 35 Además de los agentes antivíricos denominados clásicos, otros inhibidores de ADN/ARN también pueden ponerse en contacto para formar un compuesto terapéutico antivírico. En la **Tabla G** se indican agentes antivíricos ejemplares, pudiendo, cualquiera de uno o más de ellos, ponerse en contacto para preparar un conjugado antivírico de la invención, o usarse por separado en las terapias de combinación antivíricas de la invención.

TABLA G

Virus causantes de enfermedades comunes y fármacos antivíricos

Virus Causantes de Enfermedades	Categorías de Fármaco	Fármacos antivíricos ejemplares
Virus del herpes		Cidofovir, aciclovir, penciclovir (famciclovir), ganciclovir (ganciclovir), desoxiguanosina, foscarnet, idoxuridina, trifluorotimidina, vidarabina, sorivudina
Retrovirus	Inhibidores nucleosídicos de transcriptasa inversa (RT)	Zidovudina, didanosina, zalcitabina, lamivudina, estavudina, abacavir, resistencia A multinucleósido, resistencia B multinucleósido
	Inhibidores no nucleosídicos de RT	Nevirapina, delavirdina, efavirenz, Adefovir, Dipivoxil
	Inhibidores de Proteasa	Indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir, amprenavir
	Antineoplásicos específicos de fases del ciclo celular	Hidroxiurea (Hydrea™, Bristol Myers-Squibb)
Hepatitis B		Trifosfato de desoxicitosina, trifosfato de lamivudina, trifosfato de emcitabina, difosfato de adefovir, trifosfato de penciclovir, trifosfato de lobucavir
Hepatitis C		Interferón alfa, ribavirina
Gripe A y B		Amantadina, rimantadina, zanamivir, oseltamivir

5 Dentro de la serie de gomas y fármacos antivíricos, normalmente se refieren AZT y cidofovir. Independientemente del fármaco antivírico seleccionado, el conjugado antivírico se unirá a macrófagos en los pulmones, a células infectadas con virus y también puede unirse a partículas de virus. Dependiendo del enlazador o de la tecnología de conjugación que se utilice, el fármaco antivírico puede liberarse en la superficie de la célula diana y después introducirse en su interior. Preferentemente, el propio conjugado se introduce en la célula, tal como un macrófago o una célula infectada con virus. La introducción puede producirse bien de forma natural o puede medirse por virus.

10 Una vez dentro de la célula, al igual que ocurre con un conjugado de anticuerpo, la hidrólisis del enlazador libera el agente antivírico activo.

Pueden usarse otros enlazadores que contengan enlaces biológicamente lábiles, tales como, por ejemplo, enlaces disulfuro, ácido lábiles, enzimáticamente escindibles o hidrolizables. Por consiguiente, junto con los antivíricos de la presente invención, puede usarse cualquier enlace biológicamente liberable o selectivamente hidrolizable descrito para su uso en relación con agentes terapéuticos.

15

F. Equivalentes biológicamente funcionales

Equivalentes, o incluso mejoras, de una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo pueden ahora prepararse, generalmente usando los materiales proporcionados anteriormente como punto de partida. Pueden efectuarse modificaciones y cambios en la estructura de dicha construcción, receptorcuerpo o betacuerpo y seguir obteniendo una molécula que tenga las mismas características, o de otro modo, deseables. Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva. Estas consideraciones también se aplican a toxinas, a agentes antiangiogénicos, a agentes inductores de apoptosis, a coagulantes y similares.

20

Dado que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de las proteínas, pueden hacerse determinadas sustituciones en la secuencia de aminoácidos en una secuencia proteica (o por supuesto, en la secuencia de ADN subyacente) y sin embargo obtener una proteína con propiedades parecidas (agonísticas). Por tanto se contempla que puedan hacerse diversos cambios en la secuencia de los

25

anticuerpos o agentes terapéuticos (o secuencias de ADN subyacentes) sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica. Los equivalentes funcionales biológicos preparados a partir de mutación de una secuencia de ADN subyacente pueden prepararse usando la información de codones proporcionada en la **Tabla A** del presente documento y los detalles técnicos probatorios sobre la mutagénesis específica de sitio.

5

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				

10 También entenderá bien el experto en la técnica que, inherente en la definición de una proteína o péptido "equivalente funcional desde el punto de vista biológico", es el concepto de que dentro de una parte definida de la molécula puede realizarse un número de cambios limitado y seguirá resultando ser una molécula con un nivel aceptable de actividad biológica equivalente. Las proteínas y péptidos equivalentes funcionales desde el punto de vista biológico se definen por tanto en el presente documento como aquellas proteínas y péptidos en los que determinados aminoácidos, sino la mayoría o todos, pueden sustituirse. Por supuesto, una pluralidad de distintas proteínas/péptidos con diferentes sustituciones pueden prepararse fácilmente y usarse de acuerdo con la invención.

15 Generalmente las sustituciones de aminoácidos se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Un análisis del tamaño, forma y tipo de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos revela que la arginina, la lisina y la histidina son restos con carga positiva; que la alanina, la glicina y la serina son todas de tamaño similar y que la fenilalanina, el triptófano y la tirosina tienen una forma generalmente similar. Por lo tanto, basándose en estos aspectos, la arginina, la lisina y la histidina; la alanina, la glicina y la serina; y la fenilalanina, el triptófano y la tirosina, se definen en el presente documento como equivalentes funcionales desde el punto de vista biológico.

20 Al hacer cambios más cuantitativos, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático según su hidrofobicidad y características de carga; estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2);

glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

La importancia del índice hidropático de los aminoácidos confiriendo una función biológica interactiva sobre una proteína generalmente se entiende en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se sabe que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático o puntuación similar y siguen conservando una actividad biológica similar. Al hacer cambios según el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , prefiriéndose en particular los que están dentro de ± 1 y los que están dentro de $\pm 0,5$ son incluso más particularmente preferidos.

Por tanto se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tenga un valor de hidrofiliencia similar y seguir obteniendo una proteína equivalente desde el punto de vista biológico. Como se detalla en la Patente de Estados Unidos nº 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliencia a los restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

Al hacer cambios según los valores de hidrofiliencia, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliencia están dentro de ± 2 , prefiriéndose en particular los que están dentro de ± 1 y los que están dentro de $\pm 0,5$ son incluso más particularmente preferidos.

G. Conjugación

Una región Fc de anticuerpo está conectada operativamente, asociada con o conjugada a, al menos una primera proteína de unión a fosfatidilserina para proporcionar una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención. Dicha construcción, receptorcuerpo o betacuerpo puede conjugarse o conectarse adicionalmente, por ejemplo, a agentes anticelulares y citotóxicos, coagulantes y agentes antivíricos.

Aunque se prefieren los enlaces covalentes, también pueden usarse otros medios de conexión operativa. Por ejemplo, puede generarse cualquier construcción ligada usando puentes de avidina:biotina. Además del conocimiento de que disponen los expertos habituales en la técnica, la Patente de Estados Unidos del mismo propietario que la presente nº 6.093.399 se identifica específicamente con la finalidad de describir y permitir incluso adicionalmente el uso de avidina:biotina en la conexión operativa de agentes de direccionamiento con agentes biológicos y terapéuticos.

Cualquiera de dos o tres agentes también pueden unirse a través de una segunda región de unión, preferentemente una región de unión de anticuerpo o antígeno de los mismos. Esto se ilustra mediante coagulandos en los que el agente de direccionamiento está ligado al coagulante a través de una segunda región de unión (Patentes de Estados Unidos nº 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289, y 6.036.955), que se han preparado allí y usado satisfactoriamente en el tratamiento del cáncer.

La tecnología con inmunoconjugados es ahora generalmente conocida en la técnica. Sin embargo, pueden conseguirse determinadas ventajas a través de la aplicación de determinada tecnología preferida, tanto en la preparación como en la purificación para administración clínica posterior. Además, aunque se conocen numerosos tipos de enlazadores que contienen enlaces disulfuro que pueden emplearse satisfactoriamente en conjugación, generalmente se preferirán determinados enlazadores sobre otros, basándose en las diferentes características y capacidades farmacológicas. Por ejemplo, pueden preferirse enlazadores que contienen un enlace disulfuro que está "estéricamente" oculto, debido a su mayor estabilidad *in vivo*, impidiendo así la liberación antes de la unión en el sitio de acción.

Cada tipo de agente de entrecruzamiento, así como el modo en el que se realiza el entrecruzamiento, tenderá a variar la farmacodinámica del conjugado resultante. Puede desearse tener un conjugado que permanezca intacto en condiciones encontradas en cualquier parte del organismo excepto en el sitio de acción deseado, punto en el cual es deseable que el conjugado tenga buenas características de "liberación". Por lo tanto, el esquema de entrecruzamiento particular, incluyendo el reactivo de entrecruzamiento usado y las estructuras que estén entrecruzadas, tendrán cierto significado.

Dependiendo de los agentes específicos que se vayan a conjugar, puede ser necesario o deseable proporcionar un espaciador peptídico conectado operativamente a los agentes. Determinados espaciadores peptídicos pueden plegarse en una estructura en forma de bucle unido por enlace disulfuro. La escisión proteolítica dentro del bucle podría por tanto dar lugar a un polipéptido heterodimérico en el que los agentes están únicamente ligados por un solo enlace disulfuro. Un ejemplo de dicha toxina es la toxina de la cadena A de ricina.

Cuando se utilizan otros compuestos de toxinas determinados, puede proporcionarse un espaciador peptídico no escindible para conectar operativamente el compuesto de toxina de la proteína de fusión. Las toxinas que pueden usarse junto con espaciadores peptídicos no escindibles son aquellas que pueden, en sí mismas, transformarse mediante escisión proteolítica, en una forma citotóxica unida por enlace disulfuro. Un ejemplo de dicho compuesto de toxina es un compuesto exotoxina de *Pseudomonas*.

Ahora se han conjugado satisfactoriamente diversos agentes quimioterapéuticos y otros agentes farmacológicos y se demuestra que funcionan desde el punto de vista farmacológico. Los agentes antineoplásicos ejemplares que se han investigado incluyen doxorubicina, daunomicina, metrotexato, vinblastina y diversos otros. Además, se ha descrito la conexión de otros agentes, tales como neocarzinostatina, macromicina, trenimón y α -amanitina. Estos métodos de conexión pueden adaptarse para su uso con los mismos.

Cualquier enlace covalente debe prepararse idealmente en un sitio distinto del sitio (o sitios) funcional. Por tanto las composiciones están "ligadas" de cualquier manera operativa que se permite que cada región se realice y pretenden actuar sin alterarse significativamente, en particular, de manera que la construcción resultante aún se una a la PS deseada y por tanto que el uno o más agentes unidos mantengan sustancialmente la actividad biológica y/o recupere la actividad biológica cuando se libere de la construcción.

También se contempla la conexión de agentes biológicos mediante restos de hidratos de carbono en regiones Fc. La glucosilación, tanto ligada a O como a N, se produce naturalmente en anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes pueden modificarse para volver a crear o crear sitios de glucosilación adicionales si se desea, que se realiza simplemente modificando por ingeniería genética las secuencias de aminoácidos apropiadas (tales como Asn-X-Ser, Asn-X-Thr, Ser o Thr) en la secuencia primaria del anticuerpo.

G1. Agentes de entrecruzamiento bioquímicos

Además de la información general proporcionada anteriormente, pueden usarse determinados agentes de entrecruzamiento bioquímicos preferidos. Los reactivos de entrecruzamiento se usan para formar puentes moleculares que unen entre sí grupos funcionales de dos moléculas diferentes. Para ligar dos proteínas diferentes de una manera gradual, pueden usarse agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales que eliminen la formación de homopolímeros no deseada. En la **Tabla C** se indican ejemplos de agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales.

TABLA C
AGENTES DE ENTRECruzAMIENTO HETEROBIFUNCIONALES

Enlazador	Reactivo hacia	Ventajas y Aplicaciones	Longitud del Brazo Espaciador después del entrecruzamiento
SMPT	Aminas primarias Sulfhidrilos	• Mayor estabilidad	11,2 A
SPDP	Aminas primarias Sulfhidrilos	• Tiolación • Entrecruzamiento escindible	6,8 A
LC-SPDP	Aminas primarias Sulfhidrilos	• Brazo espaciador extendido	15,6 A
Sulfo-LC-SPDP	Aminas primarias Sulfhidrilos	• Brazo espaciador extendido • Hidrosoluble	15,6 A
SMCC	Aminas primarias Sulfhidrilos	• Grupo reactivo de maleimida estable • Conjugación enzima - anticuerpo • Conjugación proteína transportadora-hapteno	11,6 A
Sulfo-SMCC	Aminas primarias Sulfhidrilos	• Grupo reactivo de maleimida estable • Hidrosoluble • Conjugación enzima-anticuerpo	11,6 A
MBS	Aminas primarias Sulfhidrilos	• Conjugación enzima-anticuerpo • Conjugación proteína transportadora-hapteno	9,9 A
Sulfo-MBS	Aminas primarias Sulfhidrilos	• Hidrosoluble	9,9 A

Enlazador	Reactivo hacia	Ventajas y Aplicaciones	Longitud del Brazo Espaciador después del entrecruzamiento
SIAB	Aminas primarias Sulfhidrilos	• Conjugación enzima-anticuerpo	10,6 A
Sulfo-SIAB	Aminas primarias Sulfhidrilos	• Hidrosoluble	10,6 A
SMPB	Aminas primarias Sulfhidrilos	• Brazo espaciador extendido • Conjugación enzima-anticuerpo	14,5 A
Sulfo-SMPB	Aminas primarias Sulfhidrilos	• Brazo espaciador extendido • Hidrosoluble	14,5 A
EDC/Sulfo-NHS	Aminas primarias Grupos carboxilo	• Conjugación hapteno-transportador	0
ABH	Hidratos de carbono No selectivos	• Reacciona con grupos azúcar	11,9 A

5 Los agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales contienen dos grupos reactivos: uno que generalmente reacciona con grupos amina primarios (por ejemplo N-hidroxi succinimida) y el otro que generalmente reacciona con un grupo tiol (por ejemplo, piridil disulfuros, maleimidias, halógenos, etc.). A través del grupo reactivo amina primario, el agente de entrecruzamiento puede reaccionar con el resto (o restos) de lisina de una proteína y a través del grupo reactivo tiol, el agente de entrecruzamiento, ya unido a la primera proteína, reacciona con el resto de cisteína (grupo sulfhidrilo libre) de la otra proteína.

10 Por lo tanto, generalmente las composiciones tienen, o se derivatizan para que tengan, un grupo funcional disponible para el entrecruzamiento. Este requisito no se considera limitante ya que de esta manera puede usarse una amplia variedad de grupos. Por ejemplo, pueden usarse grupos amina primarios o secundarios, grupos hidrazida o hidrazina, alcohol carboxílico, fosfato, carbamato o grupos alquilantes para la unión o el entrecruzamiento.

15 El brazo espaciador entre los dos grupos reactivos de un agente de entrecruzamiento puede tener diversas longitudes y composiciones químicas. Un brazo espaciador más largo permite una mejor flexibilidad de los componentes conjugados aunque algunos componentes particulares en el puente (por ejemplo, grupo benceno) pueden conducir a una estabilidad extra en el grupo reactivo o a una resistencia aumentada del enlace químico con respecto a la acción de diversos aspectos (por ejemplo resistente a enlace disulfuro para agentes reductores). También se contempla el uso de espaciadores peptídicos, tales como L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala.

20 Se prefiere emplear un agente de entrecruzamiento que tenga una estabilidad razonable en sangre. Se conocen numerosos tipos de enlazadores que contienen enlaces disulfuro que pueden emplearse satisfactoriamente en la conjugación. Los enlazadores que contienen un enlace disulfuro que está estéricamente oculto pueden proporcionar una mayor estabilidad *in vivo*, prevenir la liberación del agente antes de la unión en el sitio de acción. Estos enlazadores son por tanto un grupo de agentes enlazadores preferido.

25 Uno de los agentes de entrecruzamiento más preferidos es SMPT, que es un agente de entrecruzamiento bifuncional que contiene un enlace disulfuro que está "estéricamente oculto" mediante un anillo de benceno adyacente y grupos metilo. Se piensa que el impedimento estérico del enlace disulfuro hace la función de proteger el enlace del ataque de aniones de tiolato tales como glutatión que pueden estar presentes en los tejidos y en la sangre, y por lo tanto ayudar en la prevención desacoplado el conjugado antes de la liberación del agente unido al sitio del tumor. Se contempla que el agente SMPT también pueda usarse junto con los conjugados de la presente invención.

30 El reactivo de entrecruzamiento SMPT, así como muchos otros agentes de entrecruzamiento conocidos, ofrecen la capacidad de entrecruzar grupos funcionales tales como el SH de la cisteína o aminas primarias (por ejemplo, el grupo amino épsilon de lisina). Otros tipos posibles de agentes de entrecruzamiento incluyen las fenilazinas fotorreactivas heterobifuncionales que contienen un enlace disulfuro escindible tal como sulfosuccinimidil-2-(p-azido salicilamido) etil-1-3'-ditiopropionato. El grupo N-hidroxisuccinimidilo reacciona con grupos amino primarios y la fenilazida (después de fotólisis) reacciona no selectivamente con cualquier resto de aminoácido.

Además de agentes de los agentes de entrecruzamiento ocultos, también pueden emplearse agentes de entrecruzamiento no ocultos de acuerdo con lo mismo. Otros agentes de entrecruzamiento útiles, que no se considera que contienen o generan un disulfuro protegido, incluyen SATA, SPDP y 2-iminotiolano. El uso de dichos agentes de entrecruzamiento se conoce bien en la técnica.

5 Una vez conjugado, el conjugado se separa de los agentes no conjugados y de otros contaminantes. Se disponen de diversas técnicas de purificación para su uso proporcionando conjugados de un grado de pureza suficiente para hacerlos clínicamente útiles. Los métodos de purificación basados en la separación por tamaño, tales como filtración en gel, permeación en gel o cromatografía líquida de alto rendimiento, serán generalmente los que más se usan. También pueden usarse otras técnicas cromatográficas, tales como separación con Azul de Sefarosa.

10 **G2. Enlazadores biológicamente liberables**

Aunque se prefiere que cualquier resto de unión tenga una estabilidad razonable en la sangre, para impedir la liberación sustancial del agente terapéutico unido antes de dirigirse a la enfermedad, por ejemplo, sitio del tumor, en determinados aspectos, se contempla el uso de enlaces biológicamente liberables y/o espaciadores o enlazadores selectivamente escindibles. Los “enlaces biológicamente liberables” y “espaciadores o enlazadores selectivamente escindibles” tendrán una estabilidad razonable en la circulación.

Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención puede por tanto ligarse a uno o más agentes terapéuticos o secundarios mediante un enlace biológicamente liberable. Los “enlaces biológicamente liberables” o “enlaces selectivamente hidrolizables” incluyen todos los enlaces que sean liberables, escindibles o hidrolizables únicamente o preferencialmente en determinadas condiciones. Esto incluye enlaces disulfuro y trisulfuro y enlaces ácido lábiles, como se describe en las Patentes de Estados Unidos nº 5.474.765 y 5.762.918.

El uso de un espaciador sensible a ácidos para la conexión de un agente terapéutico a una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención se contempla particularmente. En dichas realizaciones, los agentes terapéuticos se liberan en el interior de compartimentos ácidos dentro de la célula. Se contempla que la liberación sensible a ácidos pueda producirse extracelularmente, pero aún después del direccionamiento específico, preferentemente en el sitio del tumor o célula infectada con virus. Determinados ejemplos actualmente preferidos incluyen anticuerpos ligados a colchicina o doxorubicina mediante un espaciador sensible a ácidos. También se contempla la conexión de anticuerpos a través de restos de hidrato de carbono. En dichas realizaciones, el agente terapéutico se libera dentro de los compartimentos ácidos en el interior de una célula.

Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo también puede derivatizarse para introducir grupos funcionales que permitan la conexión de los agentes terapéuticos a través de un enlace biológicamente liberable. Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo puede por tanto derivatizarse para introducir cadenas laterales que terminan en hidrazida, hidracina, grupos amina secundarios o amina primarios. Los agentes terapéuticos pueden conjugarse a través de un enlace de base Schiff, una hidrazona o un enlace acil hidrazona o un enlazador de hidrazida (Patentes de Estados Unidos nº 5.474.765 y 5.762.918).

Además, como se describe en las Patentes de Estados Unidos nº 5.474.765 y 5.762.918, una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo puede conectarse operativamente a un agente terapéutico a través de uno o más enlaces biológicamente liberables que son enlaces sensibles a enzimas, incluyendo enlaces peptídicos, ésteres, amidas, fosfodiésteres y glucósidos.

Determinados aspectos de la invención se refieren al uso de enlazadores peptídicos que incluyen al menos un primer sitio escindible para una peptidasa y/o proteinasa que está preferentemente localizado dentro de un sitio enfermo, particularmente dentro del entorno tumoral. La administración del agente terapéutico unido por tanto da como resultado una escisión específicamente dentro del sitio de enfermedad o entorno tumoral, dando como resultado la liberación específica del agente terapéutico activo. Determinados enlazadores peptídicos incluirán un sitio de escisión que es reconocido por una o más enzimas implicadas en la remodelación.

Se prefieren particularmente enlazadores peptídicos que incluyan un sitio de escisión para uroquinasa, prouroquinasa, plasmina, plasminógeno, TGFβ, estafiloquinasa, Trombina, Factor IXa, Factor Xa o una metaloproteinasa, tal como colagenasa intersticial, una gelatinasa o estromelisinina. Las Patentes de Estados Unidos nº 6.004.555, 5.877.289 y 6.093.399 se identifican específicamente con la finalidad de describir adicionalmente y saber como preparar y usar inmunoconjugados que comprenden enlaces biológicamente liberables y enlazadores y péptidos selectivamente escindibles. La Patente de Estados Unidos nº 5.877.289 se identifica particularmente con la finalidad de describir adicionalmente y saber cómo preparar y usar inmunoconjugados que comprenden un enlazador peptídico selectivamente escindible que se escinde por uroquinasa, plasmina, Trombina, Factor IXa, Factor Xa o una metaloproteinasa, tal como una colagenasa intersticial, una gelatinasa o una estromelisinina, dentro de un entorno tumoral.

Los enlazadores peptídicos selectivamente escindibles preferidos en la actualidad son aquellos que incluyen un sitio de escisión para plasmina o metaloproteinasa (también conocidas como “metaloproteinasas de la matriz” o “MMP”), tal como una colagenasa intersticial, gelatinasa o una estromelisinina. Los enlazadores peptídicos adicionales que pueden usarse ventajosamente junto con la presente invención incluyen, por ejemplo, secuencias escindibles por

plasma, tales como las escindibles por prouroquinasa, TFG β , plasminógeno y estafiloquinasa; secuencias escindibles por Factor Xa; secuencias escindibles por MMP, tales como las escindibles por gelatinasa A; secuencias escindibles por colagenasa, tales como las escindibles por colágeno de piel de ternero (cadena α 1(I)), colágeno de piel de ternero (cadena α 2(I)), colágeno de cartilago de bovino (cadena α 1(II)), colágeno de hígado humano (cadena α 1(III)), α 2M humana, PZP humana, α 1M de rata, α 2M de rata, α 1I₃(2J) de rata, α 1I₃(27J) de rata y sitios de escisión autolítica de colagenasa de fibroblastos humanos. Además del conocimiento disponible para los expertos habituales en la técnica, el texto y las secuencias de la Tabla B2 en las Patentes de Estados Unidos del mismo propietario que la presente nº 6.342.219, 6.524.583, 6.342.221 y 6.416.758 se identifican específicamente con la finalidad de describir también adicionalmente y permitir el uso de dichas secuencias escindibles.

10 G3. Proteínas de fusión y expresión recombinante

Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo puede prepararse como una proteína de fusión usando técnicas de biología molecular. Cualquier proteína de fusión puede diseñarse y prepararse usando cualquier construcción, receptorcuerpo o betacuerpo y segundos agentes terapéuticos desvelados en el presente documento y los conocidos en la técnica. La tecnología de proteínas de fusión es fácilmente adaptable para preparar proteínas de fusión con otras modificaciones, tales como enlace mediante una secuencia peptídica selectivamente escindible y similar.

El uso de técnicas de ADN recombinante para conseguir dichos fines es ahora una práctica convencional para los expertos en la técnica. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Además, la síntesis de ADN y ARN puede realizarse usando sintetizadores automatizados (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al*, 1989).

La preparación de dicha proteína de fusión generalmente conlleva la preparación de una primera y una segunda región codificante de ADN y el ligamiento funcional o unión de dichas regiones, en fase, para preparar una sola región codificante que codifique la proteína de fusión deseada. Una vez que se ha producido la región codificante deseada, se crea un vector de expresión. Los vectores de expresión contienen uno o más promotores cadena arriba de las regiones de ADN insertadas que actúan para promover la transcripción del ADN y por tanto promover la expresión de la proteína recombinante codificada. Este es el significado de "expresión recombinante".

Para obtener una versión denominada "recombinante" de una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo, el vector se expresa en una célula recombinante. La modificación por ingeniería genética de uno o más segmentos de ADN para la expresión en un sistema procarionta o eucariota puede realizarse por técnicas generalmente conocidas por los expertos en la expresión recombinante. Se piensa que prácticamente cualquier sistema de expresión puede emplearse en la expresión.

Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención puede expresarse satisfactoriamente en sistemas de expresión eucariotas, por ejemplo, células CHO, sin embargo, se contempla que los sistemas de expresión bacterianos, tal como pQE-60 de *E. coli* sean particularmente útiles para la preparación a gran escala y posterior purificación de las construcciones. Los ADNc también pueden expresarse en sistemas bacterianos, expresándose las proteínas codificadas como fusiones con β -galactosidasa, ubiquitina, glutatión S-transferasa de *Schistosoma japonicum* y similares. Se piensa que la expresión bacteriana tendrá ventajas sobre la expresión eucariota en términos de facilidad de uso y cantidad de materiales obtenidos mediante la misma.

En términos de expresión microbiana, las Patentes de Estados Unidos nº 5.583.013; 5.221.619; 4.785.420; 4.704.362; y 4.366.246 se identifican con la finalidad de complementar adicionalmente la presente divulgación junto con la expresión de genes en las células hospedadoras recombinantes.

Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo producido de manera recombinante puede purificarse y formularse para su administración en seres humanos. Como alternativa, los ácidos nucleicos que codifican una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo pueden suministrarse mediante terapia génica. Aunque puede emplearse ADN recombinante desnudo o plásmidos, se prefiere el uso de liposomas o vectores. La capacidad de determinados virus para introducirse en células mediante endocitosis mediada por receptores y de integrarse en el genoma de la célula hospedadora y expresar genes de virus de manera estable y eficaz, los ha convertido en candidatos atractivos para la transferencia de genes extraños en células de mamífero. Los vectores de terapia génica preferidos para su uso en la presente invención serán generalmente vectores de virus.

Los retrovirus son prometedores como vectores de liberación de genes debido a su capacidad para integrar sus genes en el genoma hospedador, transferir una gran cantidad de material genético extraño, infectar un amplio espectro de especies y tipos de células y de empaquetarse en líneas celulares especiales. Otros virus, tales como adenovirus, virus del herpes simple (HSV), citomegalovirus (CMV) y adenovirus asociados (AAV), tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos 5.139.941, también pueden modificarse por ingeniería genética para servir como vectores para transferencia génica.

Aunque algunos virus que pueden aceptar material genético extraño están limitados en el número de nucleótidos estos pueden acomodarse y en la serie de células que infectan, estos virus han demostrado que efectúan satisfactoriamente la expresión génica. Sin embargo, los adenovirus no integran su material genético en el genoma

del hospedador y por lo tanto no requieren la replicación del hospedador para la expresión génica, haciendo que sean idealmente adecuados para una expresión génica rápida, eficaz y heteróloga. Las técnicas para preparar virus infecciosos con replicación defectuosa se conocen bien en la materia.

5 En determinadas realizaciones adicionales, el vector de terapia génica será el HSV. Un factor que hace que el HSV sea un vector atractivo es el tamaño y organización del genoma. Dado que el HSV es grande, la incorporación de genes múltiples o casetes de expresión es menos problemática que en otros sistemas víricos más pequeños. Además, la disponibilidad de diferentes secuencias de control víricas con diverso redimiento (por ejemplo temporal, fuerza) hace que sea posible controlar la expresión a un mayor grado que en otros sistemas. También es una
10 ventaja que el virus tenga relativamente pocos mensajes cortados y empalmados, facilitando adicionalmente las manipulaciones genéticas. El HSV también es relativamente fácil de manipular y puede desarrollarse a elevados títulos.

Por supuesto, en el uso de sistemas de liberación de virus, se deseará purificar el virión suficientemente para producirlo esencialmente libre de contaminantes no deseables, tales como partículas víricas de interferencia defectuosas o pirógenos de tal manera que no causen ninguna reacción adversa en la célula, animal o individuo que
15 recibe la construcción vectorial. Un medio de purificación preferido del vector implica el uso de gradientes de densidad boyante, tal como centrifugación en gradiente con cloruro de cesio.

H. Composiciones farmacéuticas

Los agentes terapéuticos de la presente invención se formularán generalmente como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas comprenderán una cantidad biológica o terapéuticamente eficaz de al menos un
20 primer agente terapéutico de la invención, disuelto o disperso en un transportador o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Los agentes terapéuticos combinados también se contemplan, y puede emplearse el mismo tipo de composiciones farmacéuticas fundamentales para medicamentos tanto simples como combinados.

Las frases “farmacéutica o farmacológicamente aceptables” se refieren a entidades moleculares y a composiciones que no producen una reacción adversa alérgica o de cualquier otro tipo no deseado, cuando se administra a un
25 animal, o a un ser humano, según sea apropiado. Igualmente se incluyen los usos veterinarios en la invención y las formulaciones “farmacéuticamente aceptables” incluyen formulaciones para uso tanto clínico como veterinario.

Como se usa en el presente documento, “transportador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas
30 es muy conocido en la técnica. En la medida en la que cualquier medio o agente convencional sea compatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Para la administración en seres humanos, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la FDA Office of Biological Standards. En las composiciones también pueden incorporarse principios activos complementarios.

Las formulaciones de “dosificación unitaria” son aquellas que contienen una dosis o subdosis del principio administrado que se adapta para una liberación particular en el tiempo. Por ejemplo, las formulaciones de “dosificación unitaria” ejemplares son aquellas que contienen una dosis o unidad diaria o una subdosis diaria o una
35 dosis o unidad semanal o una subdosis semanal y similar.

H1. Formulaciones inyectables

Los agentes terapéuticos de la invención se formularán frecuentemente para administración parenteral, particularmente para el tratamiento de tumores, por ejemplo, formulados para inyección mediante vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica u otras de este tipo, incluyendo la administración peristáltica y la instilación directa en un tumor o un sitio enfermo (administración intracavidad). La preparación de una composición acuosa que
40 contenga un anticuerpo, inmunoconjugado o conjugado peptídico como un principio activo será conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Típicamente dichas composiciones pueden prepararse como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su uso para preparar soluciones o suspensiones después de la adición de un líquido antes de inyección; y las preparaciones también pueden emulsionarse.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, 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 debe ser estéril y fluida en la medida que puedan utilizarse con una jeringa. Debe ser estable en condiciones de fabricación y conservación y debe preservarse contra la acción de microorganismos contaminantes, tales como bacterias y hongos.
50

Los agentes terapéuticos pueden formularse en una composición acuosa estéril en una forma neutra o salina. Las soluciones de agentes terapéuticos como bases libres o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezcladas adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las sales farmacéuticamente
55

5 aceptables, incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y las que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico y fosfórico o ácidos orgánicos tales como ácido acético, trifluoroacético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden proceder de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio, amoníaco, calcio o hierro, y de bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

10 Los transportadores adecuados incluyen medios disolventes y de dispersión que contienen, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similar), 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 puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y/o mediante el uso de tensioactivos.

15 En condiciones habituales de almacenamiento y uso, todas estas preparaciones deben contener un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos. La prevención de la acción de microorganismos puede realizarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

20 Antes o después de la formulación, los agentes terapéuticos deben dializarse ampliamente para retirar moléculas no deseadas de bajo peso molecular y/o liofilizarse para una formulación más fácil en un vehículo deseado, cuando sea apropiado. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los agentes activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros principios indicados anteriormente, según se desee, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los varios principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contenga el medio de dispersión básico y los otros principios requeridos de los indicados anteriormente.

25 En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y criodesecación que producen un polvo del principio activo, más cualquier principio deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada y filtrada de la misma.

30 Las composiciones farmacéuticas adecuadas de acuerdo con la invención generalmente incluirán una cantidad del agente terapéutico mezclada con un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como una solución acuosa estéril, para proporcionar una serie de concentraciones finales, dependiendo del uso que quiera darse. Las técnicas de preparación son generalmente muy conocidas en la técnica, como las que se ilustran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed. Mack Publishing Company, 1980. Para la administración en seres humanos, las preparaciones deben cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la FDA Office of Biological Standards. Después de la formulación, los agentes terapéuticos se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz.

35 H2. Formulaciones de liberación sostenida

40 Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación, tales como los tipos de soluciones inyectables descritos anteriormente, pero también se contemplan otras formas farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas u otros sólidos para administración oral, supositorios, pesarios, soluciones nasales o pulverizadores, aerosoles, inhalantes, formulaciones tópicas, formulaciones liposomales y similares. Los tipos de forma para la administración tendrán correspondencia con la enfermedad o trastorno que se vaya a tratar.

45 También se pueden usar cápsulas de "liberación lenta" o composiciones o preparaciones farmacéuticas de "liberación sostenida". Las formulaciones de liberación lenta se diseñan generalmente para ofrecer un nivel de fármaco constante sobre un periodo prolongado y pueden usarse para suministrar los agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención. Las formulaciones de liberación lenta se implantan típicamente cerca del sitio enfermo, por ejemplo, en el sitio de un tumor o infección vírica.

50 Como ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen agentes terapéuticos, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres; hidrogeles, por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico); polilactidas, por ejemplo, Patente de Estados Unidos nº 3.773.919; copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato; acetato de etilen vinilo no degradable; copolímeros degradables de ácido láctico - ácido glicólico, tales como Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida); y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico.

55 Aunque polímeros tales como acetato de etilen vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante un largo periodo de tiempo, estos pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, reduciendo de

este modo la actividad biológica y/o cambiando la inmunogenicidad. Se dispone de estrategias lógicas para la estabilización dependiendo del mecanismo que esté implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación implica la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización se realiza modificando restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas y estrategias similares.

H3. Liposomas y nanocápsulas

En determinadas realizaciones, los liposomas y/o nanocápsulas también pueden emplearse con los agentes terapéuticos. La formación y uso de liposomas es generalmente conocida por los expertos en la técnica, como se resume más adelante. La presente invención proporciona combinaciones particulares de anticuerpos, liposomas de agentes quimioterapéuticos, que se describen más adelante. Además, puede usarse una formación liposomal como un componente habitual de cualquiera de los agentes terapéuticos de la invención en general.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilaminares (también denominadas vesículas multilaminares (MLV). Generalmente, las MLV tienen diámetros de 25 nm a 4 µm. El tratamiento con ultrasonido de las MLV da como resultado la formación de vesículas unilaminares pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo.

Los fosfolípidos pueden formar diversas estructuras que no son liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la proporción molar de lípido con respecto a agua. A bajas proporciones el liposoma es la estructura preferida. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, de la fuerza iónica y de la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden presentar baja permeabilidad con respecto a sustancias iónicas y polares, pero a elevadas temperaturas experimentan una fase de transición que altera notablemente su permeabilidad. La fase de transición implica un cambio de una estructura fuertemente empaquetada, ordenada, conocida como estado gel, a una estructura laxamente empaquetada, menos ordenada, conocida como estado fluido. Esto se produce a una temperatura de transición característica y da como resultado el aumento de la permeabilidad a iones, azúcares y fármacos.

Los liposomas interaccionan con células mediante cuatro mecanismos diferentes: endocitosis por células fagocíticas, tales como macrófagos y neutrófilos, del sistema retículoendotelial; adsorción en la superficie celular, mediante fuerzas hidrófobas o electroestáticas débiles no específicas, o mediante interacciones específicas con componentes de la superficie celular; fusión con la membrana celular plasmática por inserción de la bicapa lipídica del liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea del contenido liposomal en el citoplasma; y por transferencia de lípidos liposomales a las membranas celulares o subcelulares, o viceversa, sin ninguna asociación del contenido del liposoma. La variación de la formulación del liposoma, cuyo mecanismo es operativo, puede alterarse, aunque más de uno puede ser operativo al mismo tiempo.

Las nanocápsulas pueden generalmente atrapar compuestos de una manera estable y reproducible. Para impedir efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (de un tamaño de aproximadamente 0,1 µm) deben diseñarse usando polímeros que puedan degradarse *in vivo*. Las nanopartículas de polialquil cianoacrilato biodegradables que cumplen estos requisitos se contemplan para su uso en la presente invención y dichas partículas pueden prepararse fácilmente.

H4. Formulaciones oftálmicas

Muchas enfermedades oculares, particularmente aquellas que tienen un componente angiogénico, pueden tratarse con la presente invención. Por ejemplo, enfermedad neovascular ocular, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasias retrolentales y otras enfermedades asociadas con neovascularización de la córnea o neovascularización de la retinal/coroides, como se describe más adelante en el presente documento.

Los agentes terapéuticos de la presente invención pueden emplearse por tanto de manera ventajosa en la preparación de composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso como soluciones oftálmicas, incluyendo aquellas para administración intravítrea y/o intracámara. Para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades anteriores u otros trastornos, los agentes terapéuticos se administran a uno, o a ambos ojos, del sujeto que necesite el tratamiento en forma de una preparación oftálmica preparada de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional, véase por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª edición, páginas 1488 a 1501 (Mack Publishing Co., Easton, PA).

Las preparaciones oftálmicas contendrán un agente terapéutico en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 % en peso, preferentemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 % en una solución, suspensión o pomada farmacéuticamente aceptable. Será necesario variar algo la concentración, dependiendo del compuesto particular empleado, de la afección del sujeto a tratar y similar, y la persona responsable del tratamiento determinará la concentración más adecuada para el paciente individual. La preparación oftálmica estará preferiblemente en forma de una solución acuosa estéril que contenga, si se desea, ingredientes

adicionales, por ejemplo conservantes, tampones, agentes de tonicidad, antioxidantes y estabilizantes, agentes humectantes o purificantes no iónicos, agentes aumentadores de viscosidad y similares.

5 Los conservantes adecuados para su uso en dichas soluciones incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, clorobutanol, timerosal y similares. Los tampones adecuados incluyen ácido bórico, bicarbonato de sodio y de potasio, boratos de sodio y de potasio, carbonato de sodio y de potasio, acetato de sodio, bifosfato de sodio y similares, en cantidades suficientes para mantener el pH entre aproximadamente 6 y 8 y preferentemente entre aproximadamente 7 y 7,5. Los agentes de tonicidad adecuados son dextrano 40, dextrano 70, dextrosa, glicerina, cloruro de potasio, propilenglicol, cloruro de sodio y similares, de tal manera que el equivalente de cloruro de sodio de la solución oftálmica esté en el intervalo de 0,9 más o menos 0,2 %.

10 Los antioxidantes y estabilizantes adecuados incluyen bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfito de sodio, tiourea y similares. Los agentes humectantes y purificantes adecuados incluyen polisorbato 80, polisorbato 20, poloxamer 282 y tiloxapol. Los agentes aumentadores de viscosidad adecuados incluyen dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, vaselina, polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa y similares. La preparación oftálmica se administrará por
15 vía tópica en el ojo del sujeto que necesite el tratamiento por métodos convencionales, por ejemplo, en forma de gotas o con baños oculares con la solución oftálmica.

H5. Formulaciones tópicas

20 En el sentido más amplio, las formulaciones para administración tópica incluyen las que se suministran a través de la boca (cavidad bucal) y a través de la piel. Los "sistemas de suministro tópico" también incluyen parches transdérmicos que contienen el principio activo a administrar. El suministro a través de la piel puede efectuarse adicionalmente por iontoforesis o electrotransporte, si se desea.

25 Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden los principios activos en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica; y lavados bucales que comprenden el principio a administrar en un transportador líquido adecuado.

30 Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la piel incluyen pomadas, cremas, geles y pastas que comprenden el principio a administrar en un transportador farmacéutico aceptable. La formulación de agentes terapéuticos para su uso tópico, tal como en cremas, pomadas y geles, que incluye la preparación de bases para pomada oleaginosas o solubles en agua, será bien conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, estas composiciones pueden incluir aceites vegetales, grasas animales y, más preferentemente, hidratos de carbono semisólidos obtenidos del petróleo. Los componentes particulares usados pueden incluir pomada blanca, pomada amarilla, cera de ésteres cetílicos, ácido oleico, aceite de oliva, parafina, vaselina, vaselina blanca, esperma de ballena, glicerato de almidón, cera blanca, cera amarilla, lanolina, lanolina anhidra y monoestearato de glicerilo. También pueden usarse diversas bases de pomada solubles en agua,
35 incluyendo ésteres de glicol y derivados, polietilenglicoles, estearato de polioxil 40 y polisorbatos.

40 Las formulaciones para administración en el recto pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato. Las formulaciones adecuadas para administración en la vagina pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverización que contienen, además del principio activo, transportadores tales como los que se conocen en la técnica que sean apropiados.

H6. Formulaciones nasales

Se contempla el suministro local a través de la nariz y las vías respiratorias, para tratamiento de diversas afecciones, particularmente para el uso en los métodos de tratamiento antivírico de la presente invención.

45 Estas vías de suministro también son adecuadas para suministrar agentes en la circulación sistémica. Por lo tanto, en la invención también se incluyen formulaciones de principios activos en transportadores adecuados para la administración nasal, por ejemplo, soluciones, pulverizaciones, aerosoles e inhalantes nasales. Cuando el transportador es un sólido, las formulaciones incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micras, que se administra, por ejemplo, mediante una inhalación rápida a través de las fosas nasales desde un envase con un polvo que se sujeta cerca de la nariz.

50 Las formulaciones adecuadas en las que el transportador es un líquido son útiles en la administración nasal. Las soluciones nasales normalmente son soluciones acuosas diseñadas para administrarse en las fosas nasales en gotas o pulverizaciones y se preparan de tal manera que sean similares en muchos aspectos a las secreciones nasales, de tal manera que se mantenga la acción ciliar normal. Por tanto, las soluciones nasales acuosas normalmente son isotónicas y ligeramente tamponadas para mantener un pH de 5,5 a 6,5. Además, si se desea, en la formulación puede incluirse conservantes antimicrobianos, similares a los que se usan en las preparaciones oftálmicas, y estabilizantes farmacológicos apropiados. En la técnica se conocen diversas preparaciones nasales comerciales e incluyen, por ejemplo, antibióticos y antihistaminas y se usan como tratamiento preventivo del asma.
55

Las inhalaciones e inhalantes son preparaciones farmacéuticas diseñadas para suministrar un fármaco o compuesto en el árbol respiratorio de un paciente. Se administra un vapor o vaho y alcanza el área afectada. Esta vía también puede emplearse para suministrar agentes en la circulación sistémica. Las inhalaciones pueden administrarse a través de las vías respiratoria, nasal u oral. La administración de soluciones para inhalación es únicamente eficaz si las gotitas tienen un tamaño suficientemente fino y uniforme, de tal manera que el vaho llegue a los bronquiolos.

Otro grupo de productos, también conocido como inhalaciones, y algunas veces denominados insuflaciones, comprende fármacos líquidos o finamente pulverizados que se transportan hacia el interior de las vías respiratorias usando sistemas de suministro especiales, tales como aerosoles farmacéuticos, que contienen una solución o suspensión del fármaco en un propulsor gaseoso licuado. Cuando se liberan a través de una válvula o adaptador oral adecuados, se impulsa una dosis de la inhalación medida en el tracto respiratorio del paciente. El tamaño de partícula es de vital importancia en la administración de este tipo de preparación. Se ha indicado que el tamaño óptimo de partícula para la penetración en la cavidad pulmonar es del orden de 0,5 a 7 μm . Los aerosoles presurizados producen un vaho fino y por tanto su uso se considera ventajoso.

I. Ensayos de unión, funcionales y de exploración

Aunque la presente invención tiene utilidad significativa en regímenes de tratamiento en animales y seres humanos, también tiene otros muchos usos específicos y creíbles, incluyendo usos prácticos en muchas realizaciones *in vitro*. Algunos de estos usos están relacionados con las propiedades de unión específicas de una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo. En cada una de las construcciones de la invención se incluye al menos una proteína que se une a PS o a un fosfolípido aniónico, que puede usarse en diversas realizaciones de unión, incluyendo ensayos de unión útiles.

Aunque la presencia de una región Fc o de un agente conectado, cuando sea relevante, proporcione propiedades ventajosas, no se niega la utilidad de la primera región en ningún ensayo de unión. Los ensayos de unión útiles adecuados incluyen por tanto los normalmente empleados en la técnica, tales como en inmunotransferencias, transferencias de Western, transferencias puntuales, RIA, ELISA, inmunohistoquímica, separación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y similares, como se describe adicionalmente en el presente documento.

Algunos ensayos de unión convencionales son aquellos en los que un anticuerpo se inmoviliza sobre una matriz de soporte sólido, por ejemplo, nitrocelulosa, nylon o una combinación de los mismos, tal como en las inmunotransferencias, transferencias de Western, ensayos ELISA y relacionados. Otros ensayos importantes son los que utilizan células, en los que los componentes de la presente invención pueden usarse para ensayar células con PS o fosfolípidos aniónicos en la superficie celular. Dichos ensayos pueden aplicarse en ensayos preclínicos, por ejemplo, con respecto al diseño de fármacos, ensayo de los mecanismos de acción y/o selección de agentes terapéuticos para su uso combinado.

Otros ensayos *in vitro* son útiles en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la activación celular aberrante y/o apoptosis, en el que el ensayo para determinar la presencia de PS o de fosfolípidos aniónicos en la superficie celular sería particularmente útil. Las construcciones de la invención pueden por tanto usarse junto con bloques tisulares embebidos en parafina, fijados en formalina y recién congelados, en inmunohistoquímica; en separación de células activadas por fluorescencia, citometría de flujo o microfluorometría de flujo.

Las construcciones de la invención tienen usos prácticos adicionales en inmunoprecipitación, en realizaciones de purificación con antígeno, tales como cromatografía de afinidad y en muchos otros ensayos de unión que son conocidos por los expertos habituales en la técnica dada la información presentada en este documento.

Otros usos prácticos adicionales de las presentes construcciones son como controles en ensayos funcionales, incluyendo muchos de los ensayos y sistemas *in vivo* y *ex vivo*. Como las propiedades de unión y funcionales de una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención son particularmente específicas, como se desvela en el presente documento, dichos usos de "control" son en realidad extremadamente valiosos. Los ensayos que se benefician de dicha aplicación práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, ensayos que se refieren a la detección de PS o fosfolípidos aniónicos en la superficie celular.

Estos sistemas de ensayo también pueden desarrollarse en ensayos de exploración de fármacos *in vivo* o *ex vivo*, en los que es particularmente importante el presente suministro de materiales biológicos con propiedades bien definidas. Por ejemplo, en el uso de las construcciones de la presente invención como controles positivos en la selección de moléculas pequeñas que tienen propiedades de unión similares, equivalentes o mejoradas, por ejemplo, en la exploración y desarrollo de fármacos.

Los ensayos y sistemas de unión de la invención también pueden desarrollarse en ensayos de exploración de fármacos *in vitro* o *ex vivo*, en los que es particularmente importante el presente suministro de materiales biológicos con propiedades bien definidas. Por ejemplo, en el uso de las construcciones de la presente invención como controles positivos en la selección de moléculas pequeñas que tienen propiedades de unión similares, equivalentes o mejoradas, por ejemplo, en la exploración y desarrollo de fármacos.

J. Kits de diagnóstico y terapéuticos

La presente invención también proporciona kits de diagnóstico y terapéuticos que comprenden al menos una primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la presente invención, para su uso en métodos de tratamiento, métodos de tratamiento combinados y/o en realizaciones de formación de imágenes y tratamientos. Dichos kits generalmente contendrán, en al menos un primer envase (o medio de envase) adecuado, una formulación farmacéuticamente aceptable de al menos una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención. Los kits pueden incluir instrucciones por escrito o electrónicas para su uso, por ejemplo, en realizaciones preclínicas, clínicas y/o veterinarias.

Los kits también pueden contener otras composiciones, formulaciones farmacéuticamente aceptables y segundos agentes biológicos y terapéuticos incluyendo aquellos para terapia combinada y/o para el diagnóstico y formación de imágenes. Por ejemplo, dichos kits pueden contener uno cualquiera o más de una serie de agentes quimioterapéuticos, radioterapéuticos o antiangiogénicos, células antitumorales, anticuerpos contra el sistema vascular tumoral o contra estroma tumor, inmunotoxinas o coagulandos, agentes antivíricos y/o componentes o agentes de diagnóstico. También pueden incluirse instrucciones por escrito o electrónicas para su uso en terapia combinada y/o para el diagnóstico y formación de imágenes.

Los kits pueden tener un solo envase que contenga la primera construcción, receptorcuerpo o betacuerpo, con o sin ningún componente adicional, o pueden tener distintos envases para cada agente deseado. Cuando se proporcionan agentes terapéuticos combinados, puede mezclarse previamente una sola solución, bien en una combinación equivalente molar, o con un componente en exceso con respecto al otro. Como alternativa, en el kit, el primer agente terapéutico de la invención y el segundo agente biológico o terapéutico, tal como un segundo agente anticanceroso o antivírico, se mantendrán por separado dentro de distintos envases del kit antes de la administración al paciente.

Los componentes de diagnóstico se mantendrán más frecuentemente en al menos un segundo envase, distinto del otro o un primer envase que comprenda uno o más agentes terapéuticos. Los kits de diagnóstico pueden incluir anticuerpos marcados o péptidos que se unen a PS, o cualquier otro agente adecuado para el diagnóstico de la enfermedad a tratar. Los kits pueden incluir agentes de diagnóstico para su uso *in vitro*, para su uso *in vivo*, o ambas cosas de dicho agente. Los kits pueden incluir instrucciones por escrito o electrónicas para su uso, por ejemplo, en realizaciones preclínicas, clínicas y/o de diagnóstico veterinario.

Para la inmunodetección *in vitro*, una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo puede estar unido a un soporte sólido, tal como un pocillo de una placa de microtitulación. Los kits de inmunodetección comprenden preferentemente al menos un primer reactivo de inmunodetección. Los reactivos de inmunodetección del kit pueden tener cualquiera de una diversidad de formas, incluyendo aquellos marcadores detectables que están asociados con o ligados con el anticuerpo determinado, tal como se usa *in vivo*. También se contemplan marcadores detectables que están asociados o conectados a un ligando de unión secundario. Los ligandos secundarios ejemplares son aquellos anticuerpos secundarios que tienen afinidad de unión por el primer anticuerpo.

Otros reactivos de inmunotinción, adecuados para su uso en los presentes kits, incluyen el reactivo de dos componentes que comprende un anticuerpo secundario, que tiene afinidad de unión por el primer anticuerpo, junto con un tercer anticuerpo, que tiene afinidad de unión por el segundo anticuerpo, estando el tercer anticuerpo ligado a un marcador detectable. En la técnica se conocen diversos marcadores ejemplares y todos dichos marcadores pueden emplearse junto con la presente invención. Estos kits pueden contener conjugados de anticuerpo-marcador bien en forma completamente conjugada, en forma de productos intermedios o como restos separados que los conjugará el usuario del kit. Los kits de formación de imágenes comprenderán preferentemente un agente o anticuerpo de direccionamiento que ya está conectado con un marcador detectable *in vivo*. Sin embargo, el marcador y los medios de conexión pueden proporcionarse individualmente.

Cualquier forma de kit para diagnóstico puede comprender adicionalmente agentes de control, tal como composiciones biológicas adecuadamente divididas en alícuotas, marcadas o no, como las pueden usarse para preparar una curva patrón para un ensayo de detección. Los componentes de los kits pueden envasarse en medios acuosos o en forma liofilizada.

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una o más soluciones líquidas, la solución líquida es preferentemente una solución acuosa, prefiriéndose en particular una solución acuosa estéril. Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como uno o más polvos secos. Cuando los reactivos o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente puede proporcionarse también en otro envase dentro del kit.

Los envases de los kits terapéuticos y de diagnóstico generalmente incluirán al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otro envase o medio de envase, en el que se coloca el agente terapéutico o cualquier otro agente deseado y, preferentemente dividido adecuadamente en alícuotas. Como al menos se prefieren dos componentes distintos, los kits incluirán preferentemente al menos dos de dichos envases. Los kits también pueden comprender un tercer o cuarto envase que contenga un tampón u otro diluyente, estéril, farmacéuticamente aceptable.

Los kits también pueden contener un medio mediante el cual se administren los agentes terapéuticos a un animal o paciente, por ejemplo, una o más agujas o jeringas, o incluso un cuentagotas, una pipeta u otro aparato similar, a partir del cual las formulaciones pueden inyectarse al animal o aplicarse a un área enferma del organismo. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener los viales, o similar, y otro componente, en estrecho confinamiento para su comercialización, tal como, por ejemplo, envases de plástico o moldeados por soplado para inyección, en los que se colocan y se sujetan los viales deseados u otros aparatos.

J. Inmunodetección y formación de imágenes

La presente invención proporciona adicionalmente métodos de diagnóstico y formación de imágenes *in vitro* e *in vivo*. Dichos métodos son aplicables para su uso en la generación de información de diagnóstico, pronóstico y/o formación de imágenes, por ejemplo, relacionada con enfermedades angiogénicas e infecciones víricas y preferentemente relacionada con el tratamiento de tumores y métodos de formación de imágenes. Los métodos de la invención incluyen ensayos de diagnóstico *in vitro*, por ejemplo, en el que las muestras pueden obtenerse de una manera no invasiva y ensayarse preferentemente en ensayos de alto rendimiento y/o en el que el diagnóstico clínico es ambiguo y se desea la confirmación. En el campo del diagnóstico y de la formación de imágenes *in vivo*, una construcción, receptorcuerpo, o betacuerpo de la invención está ligado a uno o a más agentes detectables y se usa para formar una imagen de un sitio angiogénico o tumor, opcionalmente como una primera etapa antes del tratamiento.

K1. Métodos y kits de inmunodetección

La invención por tanto se refiere a métodos de inmunodetección para la unión, purificación, cuantificación o detección, generalmente de otra manera, de PS y fosfolípidos aniónicos, por ejemplo, para su uso en el diagnóstico de células activadas y apoptóticas y enfermedades asociadas. Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la presente invención puede emplearse para detectar PS y fosfolípidos aniónicos *in vivo* (véase más adelante), en muestras de tejido aisladas, biopsias o frotis y/o en muestras de tejido homogeneizado. Dichos métodos de inmunodetección tienen utilidad diagnóstica manifiesta, pero también tienen aplicaciones en muestras no clínicas, tales como el ajuste de dosis de muestras de antígeno y similares.

Las etapas de los diversos métodos de inmunodetección útiles se han descrito en la bibliografía científica, tal como, por ejemplo, Nakamura *et al.*, 1987. En general, los métodos de inmunounión incluyen la obtención de una muestra que se sospecha que contiene PS o fosfolípidos aniónicos, preferentemente células que se sospecha que tienen PS en la superficie celular, y poner en contacto la muestra con una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, en condiciones eficaces para permitir la formación de inmunocomplejos. Cualquier inmunocomplejo formado durante el proceso de unión se detecta después y preferentemente se cuantifica.

La muestra analizada puede ser una muestra de células, tal como células expuestas a determinadas condiciones de ensayo en el laboratorio. La muestra también puede ser una muestra biológica de un animal o de un paciente, por ejemplo, uno que se sospecha que tiene una enfermedad asociada con la activación o apoptosis de uno o más tipos de células. Dicha muestra puede ser una sección o un espécimen tisular, una biopsia, un hisopo o frotis de la muestra de ensayo, un extracto tisular homogeneizado o formas distintas o purificadas de los mismos.

La puesta en contacto de la muestra biológica seleccionada con una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos (inmunocomplejos primarios) es generalmente una cuestión de simplemente añadir una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo a la muestra e incubar la mezcla durante un periodo de tiempo suficientemente largo para que la construcción, el receptorcuerpo o betacuerpo forme inmunocomplejos con, es decir, uniéndose a, cualquier PS o fosfolípidos aniónicos presentes. Después de este tiempo, la composición de la muestra, tal como una sección de tejido o una placa ELISA, generalmente se lavará para retirar cualquiera de las especies no unidas específicamente, dejando únicamente aquellas específicamente unidas en los inmunocomplejos primarios a detectar.

La detección de la formación del inmunocomplejo es bien conocida en la técnica y puede realizarse a través de la aplicación de numerosas estrategias. Estos métodos se basan generalmente en la detección de una etiqueta o marcador, tal como cualquier etiqueta o marcador radioactivo, fluorescente, biológico o enzimático conocido en la técnica. Las patentes de Estados Unidos que se refieren al uso de dichos marcadores incluyen 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. En general se prefiere el uso de enzimas que generan un producto con color después de la puesta en contacto con un sustrato cromogénico. También pueden usarse, ligandos de unión secundarios, tales como un anticuerpo secundario o una disposición de unión a ligando de biotina/avidina, como se conoce en la técnica.

Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo empleado en la detección puede en sí mismo ligarse a un marcador detectable, en el que se podría detectar simplemente este marcador, permitiendo por tanto determinar la cantidad de inmunocomplejos primarios en la composición.

Preferentemente, los inmunocomplejos primarios se detectan mediante un segundo ligando de unión que tiene afinidad de unión por una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención. En dichos casos, el segundo

ligando de unión puede ligarse a un marcador detectable. El segundo ligando de unión es en sí mismo a menudo un anticuerpo, y puede por tanto denominarse anticuerpo "secundario". El inmunocomplejo primario se pone en contacto con el ligando de unión secundario o anticuerpo, marcado, en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de los inmunocomplejos secundarios. Los inmunocomplejos secundarios generalmente se lavan después para retirar cualquiera de los anticuerpos o ligandos secundarios marcados no unidos específicamente, y después detectar el marcador restante en los inmunocomplejos secundarios.

Los métodos adicionales incluyen la detección de inmunocomplejos primarios mediante una estrategia en dos etapas. Un segundo ligando de unión, tal como un anticuerpo, que tiene afinidad de unión por el primer anticuerpo se usa para formar inmunocomplejos secundarios, como se ha descrito anteriormente. Después del lavado, los inmunocomplejos secundarios se ponen en contacto con el tercer ligando de unión o anticuerpo que tiene afinidad de unión por el segundo anticuerpo, de nuevo en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos (inmunocomplejos terciarios). El tercer ligando o anticuerpo se liga a un marcador detectable, lo que permite la detección de los inmunocomplejos terciarios así formados. Este sistema puede proporcionar amplificación de señal si se desea.

El diagnóstico o la monitorización pueden aplicarse a pacientes con diversas enfermedades, particularmente las asociadas con exposición aumentada de PS o de fosfolípidos aniónicos en la superficie celular. La detección de PS o de fosfolípidos aniónicos, o un aumento en los niveles de PS o de fosfolípidos aniónicos, en comparación con los niveles en una muestra biológica correspondiente de un sujeto normal, es indicativa de un paciente con dicha enfermedad.

Sin embargo, como saben los expertos en la técnica, probablemente dicho diagnóstico clínico no debería realizarse basándose en este método en aislamiento. Los expertos en la técnica están muy familiarizados con la diferenciación entre una expresión significativa de un biomarcador, que representa una identificación positiva, y bajo nivel o expresión de fondo de un biomarcador. De hecho, los niveles de expresión de fondo a menudo se usan para formar un "límite" por encima del cual la tinción aumentada se puntuará como significativa o positiva.

K2. Formación de imágenes *in vivo*

La presente invención proporciona diversas realizaciones de diagnóstico y de formación de imágenes *in vivo*. Determinados aspectos de la invención se refieren a nuevas composiciones y sorprendentemente eficaces para el diagnóstico y formación de imágenes *in vivo*. Por ejemplo, una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención se liga a un agente detectable *in vivo* para formar un conjugado de inmunodiagnóstico de la invención. Los inmunodiagnósticos resultantes pueden ahora usarse en cualquiera de las realizaciones de diagnóstico o formación de imágenes descrita previamente en relación con la detección de PS o de un fosfolípido aniónico.

En este sentido, el inmunodiagnóstico que comprende una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, puede usarse en la formación de imágenes de trombosis vascular, particularmente en o cerca del corazón, tal como en trombosis de vena profunda, embolismo pulmonar, infarto de miocardio, fibrilación auricular, problemas con materiales cardiovasculares protésicos, ictus y similares. Dichas composiciones de la invención también pueden usarse en formación de imágenes de plaquetas activadas, por ejemplo, en condiciones tales como abscesos, restenosis, inflamación de articulaciones y trastornos hemostáticos, tal como trombosis arterial, coronaria, venosa y cerebral y similar. Las composiciones de inmunodiagnóstico de la invención también pueden usarse en la detección de células apoptóticas, ya que pueden usarse en el diagnóstico y formación de imágenes de diversas enfermedades en las que se produce un aumento de la apoptosis o esta es inapropiada.

Las composiciones de formación de imágenes *in vivo* y los métodos de la invención pueden usarse de por sí en formación de imágenes, o en la formación de imágenes previa, en un sitio en el organismo para formar una imagen fiable antes del tratamiento. Preferentemente, la formación de imágenes es una formación de imágenes tumoral. Estas composiciones y métodos también pueden aplicarse a la formación de imágenes y diagnóstico de otras enfermedades o afecciones asociadas con PS y fosfolípidos aniónicos, tales como las que implican la activación celular y/o apoptosis, incluyendo enfermedades angiogénicas, aterosclerosis, infecciones víricas y otras de dichas afecciones en las que se desea realizar una formación de imagen interna con el fin de diagnosticar o pronosticar, o diseñar el tratamiento.

En estas realizaciones, una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención está conectado operativamente, ligado o conjugado con un marcador detectable. Los "marcadores detectables" son compuestos o elementos que pueden detectarse debido a sus propiedades funcionales específicas, o características químicas, cuyo uso permite detectar el componente al cual está conectado y adicionalmente cuantificarlo si se desea. En los conjugados para los protocolos de diagnóstico *in vivo* o "métodos de formación de imágenes", los marcadores pueden detectarse usando métodos no invasivos.

Muchos agentes de formación de imágenes apropiados son conocidos en la técnica, como lo son los métodos para su conexión a ligandos de unión (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.021.236 y 4.472.509). Determinados métodos de conexión implican el uso de un complejo metálico de quelato que emplea, por ejemplo, un agente quelante orgánico, tal como DTPA conectado al anticuerpo (Patente de Estados Unidos 4.472.509). Los

anticuerpos monoclonales también pueden reaccionar con una enzima en presencia de un agente de acoplamiento, tal como glutaraldehído o peryodato. Los conjugados con marcadores de fluoresceína se preparan en presencia de estos agentes de acoplamiento o por reacción con un isotiocianato.

5 Un ejemplo de marcadores detectables son los iones paramagnéticos. En este caso, como iones adecuados se 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), prefiriéndose particularmente el gadolinio.

10 Los iones útiles en otros contextos, tales como formación de imágenes por rayos X, incluyen, pero sin limitación, lantano (III), oro (III), plomo (II) y especialmente bismuto (III). Los marcadores fluorescentes incluyen rodamina, fluoresceína y renografina. La rodamina y la fluoresceína a menudo están ligadas mediante un producto intermedio de isotiocianato.

15 En el caso de isótopos radioactivos para aplicaciones de diagnóstico, los ejemplos adecuados incluyen ¹⁴C carbono, ⁵¹Cr cromo, ³⁶Cl cloro, ⁵⁷Co cobalto, ⁵⁸Co cobalto, ⁶⁷Cu cobre, ¹⁵²Eu, ⁶⁷Zn galio, ³H hidrógeno, ¹²³I yodo, ¹²⁵I yodo, ¹³¹I yodo, ¹¹¹In indio, ⁵⁹Fe hierro, ³²P fósforo, ¹⁸⁸Re renio, ¹⁸⁸Re renio, ⁷⁵Se selenio, ³⁵S sulfuro, ^{99m}Tc tecnecio e ⁹⁰Yttrio. Prefiriéndose con frecuencia el ¹²⁵I para su uso en determinadas realizaciones y prefiriéndose también con frecuencia el tecnecio ^{99m}Tc y el indio ¹¹¹In por su baja energía e idoneidad para una detección de amplio alcance.

20 Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo marcado con radioactividad para su uso en la presente invención puede producirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, grupos funcionales intermedios que a menudo se usan para unir iones metálicos radioisótopos con anticuerpos son el ácido dietiltriaminapentaacético (DTPA) y el ácido etilendiaminatetraacético (EDTA).

25 Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo también puede yodarse poniéndose en contacto con yoduro de sodio o de potasio y un agente oxidante químico tal como hipoclorito de sodio, o un agente oxidante enzimático, tal como lactoperoxidasa. Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de acuerdo con la invención puede marcarse con tecnecio ⁹⁹Tc, mediante un proceso de intercambio de ligando, por ejemplo, reduciendo el pertechnetato con solución estañosa, quelando el tecnecio reducido sobre una columna Sephadex y aplicando el anticuerpo a esta columna. Las técnicas de marcaje directo también son adecuadas, por ejemplo, incubando pertechnetato, un agente reductor tal como SnCl₂, una solución tampón tal como solución ftalato de sodio-potasio y el anticuerpo.

30 En los aspectos de formación de imágenes de la invención puede usarse cualquiera de los tipos anteriores de ligandos de unión marcados de manera detectable, solo para la formación de imágenes o para formar una imagen de un sitio enfermo o tumor antes del tratamiento. En cualquier modo, los métodos comprenden generalmente administrar a un animal o a un paciente una cantidad diagnósticamente eficaz de una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo que está conjugada con un marcador que puede detectarse mediante métodos no invasivos. La unión del conjugado ligando-marcador se permite durante un tiempo suficiente para localizar y unirse a células que expresen PS o fosfolípidos aniónicos en el sitio enfermo, tal como el tumor o el sistema vascular tumoral. Después, el paciente se expone a un dispositivo de detección para identificar el marcador detectable, formando de este modo una imagen del sitio enfermo o tumor.

35 Los isótopos de resonancia de espín magnético nuclear, tal como gadolinio, se detectan usando un dispositivo de formación de imágenes magnéticas nucleares; y las sustancias radioactivas, tales como tecnecio ^{99m}Tc o indio ¹¹¹In se detectan usando una cámara o un detector de centelleo de rayos gamma. La Patente de Estados Unidos n° 5.627.036, proporciona una orientación adicional con respecto a la introducción inocua y eficaz de construcciones marcadas de manera detectable, en la sangre de un individuo y medios para determinar la distribución del agente marcado de manera detectable extracorporalmente, por ejemplo, usando una cámara de centelleo de rayos gamma o mediante una medición de resonancia magnética.

45 Para las realizaciones de formación de imágenes, las dosificaciones son generalmente menores que para la terapia, pero también dependen de la edad y del peso del paciente. Se considera que es útil una sola dosis de entre aproximadamente 0,1, 0,05 o aproximadamente 1 mg y de aproximadamente 9 o 10 mg y más preferentemente, de entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 5-10 mg de anticuerpo o conjugado ligando de unión por paciente.

K3. Marcador indirecto para la terapia del cáncer

50 Respecto al diagnóstico y a la formación de imágenes *in vivo*, la presente divulgación también proporciona composiciones y métodos para su uso como un marcador indirecto para la terapia del cáncer. Dichas realizaciones se refieren al uso de una construcción receptorcuerpo o betacuerpo de la divulgación ligado a un agente detectable *in vivo*.

55 Muchas terapias contra el cáncer en uso actual inducen la apoptosis y necrosis. Los fosfolípidos aniónicos, particularmente la PS, son marcadores de células preapoptóticas y apoptóticas. Por lo tanto, puede usarse la formación de imágenes con una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo adecuados para identificar células preapoptóticas y apoptóticas y por tanto proporcionar información con respecto al progreso de la terapia. Esto es lo que significa "marcador indirecto para la terapia del cáncer", como se usa en el presente documento.

5 El uso de una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención proporciona ventajas particulares como un marcador indirecto para la terapia del cáncer. Por ejemplo, la capacidad de identificar células preapoptóticas es una ventaja particular. La especificidad también proporcionará datos de formación de imágenes más significativos para el médico. Además, el perfil de seguridad es impresionante y proporciona ventajas sobre la anexina, por ejemplo, ya que la anexina tiene el inconveniente de que se asocia con coagulación.

Por consiguiente, cualquiera de los métodos de diagnóstico y de formación de imágenes *in vivo* descritos anteriormente puede adaptarse para su uso pronóstico como un marcador indirecto para la terapia del cáncer simplemente mediante el uso en un paciente que se somete a terapia del cáncer.

L. Tratamiento del tumor

10 Importantes aspectos de la presente invención se refieren al tratamiento de neoplasias malignas, tumores y tumores vascularizados. Esto incluye tumores en los que la angiogénesis es más o menos importante y los tumores tienen vasos sanguíneos protrombóticos. En la invención se incluye el tratamiento de tumores benignos, tales como neuroma acústico, neurofibroma, tracoma, granulomas criogénicos e hiperplasia prostática benigna (BPH). También se incluye el tratamiento de tumores en sangre, tales como leucemias y diversas enfermedades neoplásicas agudas
15 o crónicas de la médula ósea.

La presente invención es ampliamente aplicable al tratamiento de cualquier tumor maligno, tanto si tiene un componente vascular como si no lo tiene. Los tumores para el tratamiento incluyen tumores sólidos, particularmente carcinomas, que requieren un componente vascular para el suministro de oxígeno y nutrientes. Los tumores sólidos
20 ejemplares que pueden tratarse usando la invención incluyen, pero sin limitación, carcinomas del pulmón, mama, ovario, estómago, páncreas, laringe, esófago, testículos, hígado, parótida, tracto biliar, colon, recto, cuello uterino, útero, endometrio, riñón, vejiga, próstata, tiroides, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas microcíticos, melanomas, gliomas, glioblastomas, neuroblastomas y similares.

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

Aunque la intención de la presente invención no es ser generalmente un tratamiento preventivo o profiláctico, su uso no está por supuesto limitado al tratamiento de pacientes que solo tienen tumores de tamaño moderado o más
30 grandes. Hay muchas razones detrás de estos aspectos de la invención. Por ejemplo, un paciente que presenta un tumor primario de tamaño moderado o superior también puede tener diversos otros tumores metastásicos que se considera que son de menor tamaño o incluso están en estadios más precoces de siembra tumoral metastásica. Dado que una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención se administra generalmente en la
35 circulación sistémica de un paciente, tendrán naturalmente efectos sobre los tumores secundarios, más pequeños y metastásicos, aunque esta puede no ser la intención inicial del tratamiento. Además, incluso en situaciones en las que la masa tumoral como un todo es un solo tumor pequeño, determinados efectos antitumorales beneficiosos resultarán con el uso de los presentes tratamientos.

La orientación proporcionada en el presente documento con respecto a los pacientes adecuados para su uso en
40 relación con la presente invención pretende enseñar que determinados perfiles de pacientes pueden ayudar a seleccionar pacientes para el tratamiento con la presente invención. La preselección de determinados pacientes, o categorías de pacientes, no niega en ningún modo la utilidad básica de la presente invención en relación con el tratamiento de todos los pacientes que tienen cáncer. Una consideración adicional es el hecho de que el ataque sobre el tumor proporcionado por la terapia con anticuerpos de la invención puede predisponer al tumor a un
45 tratamiento terapéutico adicional, de tal manera que el tratamiento posterior produzca en un efecto sinérgico global o incluso conduzca a una remisión o cura total.

Se piensa que no debe excluirse ningún tipo de tumor particular usando la presente invención. Sin embargo, el tipo de células tumorales puede ser relevante para el uso de la invención en combinación con agentes terapéuticos
50 terciarios, particularmente agentes quimioterapéuticos e inmunotoxinas contra células tumorales. Dado que la presente invención incluye en sus modos de acción el direccionamiento y la destrucción del sistema vascular tumoral, y que la vasculatura es sustancialmente o totalmente igual en todos los tumores sólidos, se entenderá que la presente metodología sea en su totalidad ampliamente aplicable al tratamiento de todos los tumores sólidos, independientemente del fenotipo o genotipo particular de las propias células tumorales. Los datos presentados en el presente documento son convincentes ya que muestran resultados sorprendentes en una amplia serie de diferentes modelos tumorales.

55 Las dosis terapéuticamente eficaces pueden determinarse fácilmente usando datos de un modelo animal, como se muestra en los estudios detallados del presente documento, y de datos clínicos usando una serie de agentes terapéuticos. Los animales experimentales portadores de tumor sólido se usan frecuentemente para optimizar dosis terapéuticas apropiadas antes de traducirse a un entorno clínico. Se sabe que dichos modelos son muy fiables en la

predicción de estrategias eficaces contra el cáncer. Por ejemplo, ratones portadores de tumores sólidos, tales como los de los Ejemplos, se usan ampliamente en ensayo preclínico. Los autores de la presente invención han usado dicho modelo de ratón previamente aceptado para determinar intervalos de trabajo de agentes terapéuticos que proporcionen efectos antitumorales beneficiosos con una mínima toxicidad.

5 En términos de terapia tumoral, teniendo en cuenta los beneficios de seguridad acompañantes asociados con la invención en su conjunto, se puede hacer referencia a la bibliografía científica y de patentes basándose en el éxito de uso de otras terapias antivasculares. Como ejemplo, pueden aplicarse las Patentes de Estados Unidos nº 5.855.866; 5.877.289; 5.965.132; 6.051.230; 6.004.555; 5.776.427; 6.004.554; 6.036.955; y 6.093.399 con el fin de describir adicionalmente el uso de dichos agentes para los de la presente invención. Las Patentes de Estados Unidos nº 6.312.694, 6.783.760, 6.818.231 y 6.406.693 para una orientación sobre la dosificación y tratamiento usando anticuerpos conjugados con PS e inmunocombinados relacionados.

10 Como se sabe en la técnica, hay objetivos realistas que pueden usarse como una directriz junto con el ensayo preclínico antes de proceder al tratamiento clínico. Sin embargo, debido a la seguridad ya demostrada en modelos aceptados, el ensayo preclínico de la presente invención será más una cuestión de optimización, en lugar de confirmar la eficacia. Por tanto, el ensayo preclínico puede emplearse para seleccionar los agentes, dosis o combinaciones más ventajosas.

15 Cualquier dosis, método combinado o medicamento que de cómo resultado un efecto antitumoral detectable de forma coherente, incluyendo regresión vascular tumoral detectable, trombosis y/o destrucción y necrosis tumoral, se definirá como útil en la invención. Los efectos regresivos, trombóticos, destructores y necróticos deben observarse preferentemente entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 40-50 % de los vasos sanguíneos tumorales y tejidos tumorales, observándose un aumento de hasta entre aproximadamente 50 % y aproximadamente 99 % de dichos efectos. La presente invención también puede ser eficaz contra vasos aguas abajo del tumor, es decir, dirigirse a al menos un subconjunto de los vasos de drenaje, particularmente como citocinas liberadas del tumor que actuarán en los vasos, cambiando su perfil antigénico.

20 También se entenderá que incluso en circunstancias tales en las que los efectos antitumorales de la terapia estén hacia el extremo inferior de este intervalo, puede ser que esta terapia sea igualmente o incluso más eficaz que las otras terapias conocidas en el contexto del tumor particular. Desgraciadamente es obvio para un médico que determinados tumores no puedan tratarse eficazmente en un plazo de tiempo intermedio o prolongado, pero no se niega la utilidad de la presente terapia, particularmente cuando es al menos casi tan eficaz como otras estrategias generalmente propuestas.

25 En el diseño de dosis apropiadas de una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo para el tratamiento de tumores vascularizados, se puede extrapolar fácilmente a partir de estudios animales descritos en el presente documento para llegar a dosis apropiadas para la administración clínica. Para conseguir esta conversión, se podría representar la masa de los agentes administrados por unidad de masa del animal experimental y, preferentemente, representar las diferencias en el área superficial corporal entre área experimental y el paciente humano. Todos estos cálculos son bien conocidos y habituales para los expertos en la materia.

30 Por ejemplo, tomando las dosis satisfactorias de los agentes terapéuticos usados en los estudios con ratones y aplicando cálculos estándar basados en masa y área superficial, dosis eficaces de agentes para su uso en pacientes humanos estarían entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de anticuerpo por paciente, y preferentemente, entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 100 mg de anticuerpo por paciente.

35 Por consiguiente, usando esta información, los autores de la invención contemplan que dosis bajas útiles para administración en seres humanos serán de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o aproximadamente 30 mg o así por paciente; y dosis altas útiles para administración en seres humanos serán de aproximadamente 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o aproximadamente 500 mg más o menos por paciente. Se contemplan dosis intermedias útiles para administración en seres humanos de aproximadamente 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 o aproximadamente 225 mg más o menos por paciente. En general, se preferirán intervalos de dosificación de entre aproximadamente 5-100 mg, aproximadamente 10-80 mg, aproximadamente 20-70 mg, aproximadamente 25-60 mg o aproximadamente 30-50 mg por paciente. Sin embargo, se contempla cualquier intervalo particular que use cualquiera de las dosis ejemplares indicadas anteriormente o cualquier valor intermedio entre los intervalos indicados particulares.

40 A pesar de los intervalos indicados, se entenderá que, dados los parámetros y la orientación detallada presentada en el presente documento, en la presente invención se incluirán variaciones adicionales en los intervalos activos u óptimos. Por tanto, se entenderá que pueden ser más apropiadas dosis más bajas en combinación con determinados agentes y que pueden tolerarse dosis incluso más altas, en particular, dada la mayor seguridad de las presentes construcciones. El uso de construcciones humanas y de efectores humanos hace que la presente invención sea incluso más segura para su uso clínico, reduciendo adicionalmente la probabilidad de toxicidad significativa o de efectos secundarios en tejidos sanos.

45 La intención de los regímenes terapéuticos de la presente invención es generalmente producir efectos antitumorales

significativos manteniendo al mismo tiempo que se mantiene la dosis por debajo de los niveles asociados con toxicidad inaceptable. Además de variar la propia dosis, el régimen de administración también puede adaptarse para optimizar la estrategia de tratamiento. Una estrategia de tratamiento actualmente preferida es administrar entre aproximadamente 1-500 mg, y preferentemente, entre aproximadamente 10-100 mg del anticuerpo, o coctel terapéutico que lo contenga, aproximadamente 3 veces en un periodo de tiempo de aproximadamente 7 días. Por ejemplo, se proporcionarían dosis aproximadamente el día 1, día 3 o 4 y día 6 o 7.

En la administración de las propias dosis particulares, se preferirá proporcionar al paciente, por vía sistémica, una composición farmacéuticamente aceptable (de acuerdo con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, pureza y seguridad general de la FDA). Generalmente, se prefiere la inyección intravenosa y el método más preferido es emplear una infusión continua durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 o 2 horas más o menos. Aunque no se requiera determinar dichos parámetros antes del tratamiento usando la presente invención, debe observarse que los estudios detallados en el presente documento dan como resultado al menos algún tipo de trombosis que se observa específicamente en los vasos sanguíneos de un tumor sólido al cabo de aproximadamente 12-24 horas de inyección y que las propias células tumorales comienzan a morir al cabo de aproximadamente 24 a 72 horas. La necrosis tumoral propagada se observa generalmente en las siguientes aproximadamente 48-96 horas, hasta e incluyendo, más de 60 % de la necrosis observada.

Naturalmente, antes del uso generalizado, deben realizarse ensayos clínicos. Los diversos elementos de realización de un ensayo clínico, incluyendo el tratamiento y la monitorización del paciente, serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. La siguiente información se presenta como una orientación general para su uso en el establecimiento de dichos ensayos.

Los pacientes que se seleccionan para los estudios del primer tratamiento no habrán respondido a al menos un ciclo de terapia convencional y tendrán una enfermedad objetivamente medible determinada mediante un examen físico, técnicas de laboratorio y/o procedimientos radiográficos. Debe suspenderse cualquier tipo de quimioterapia al menos 2 semanas antes de participar en el estudio. Cuando se emplean anticuerpos monoclonales, o partes de anticuerpos, murinos, los pacientes no deben presentar un historial de alergia a la inmunoglobulina de ratón.

El uso de un catéter venoso central permanente con un puerto de lumen triple, ofrece diversas ventajas. Los agentes terapéuticos deben filtrarse, por ejemplo, usando un filtro de 0,22 μ , y diluirse apropiadamente, tal como con solución salina, a un volumen final de 100 ml. Antes del uso, la muestra de ensayo también debe filtrarse de manera similar, y su concentración debe analizarse antes y después de la filtración determinando la A_{280} . La recuperación esperada debe de estar en el intervalo del 87 % al 99 %, y después representarse los ajustes con respecto a la pérdida de proteínas.

Las construcciones pueden administrarse durante un periodo de tiempo aproximadamente 4 a 24 horas, recibiendo cada paciente de 2 a 4 infusiones a intervalos de 2 a 7 días. La administración también puede realizarse mediante una tasa de infusión continua durante un periodo de 7 días. La infusión dada a cualquier nivel de dosis debe depender de cualquier tipo de toxicidad observado. Por ejemplo, si se alcanza un grado de toxicidad II después de cualquier infusión simple, o durante un periodo de tiempo particular para una tasa de infusión continua, las dosis posteriores deben descartarse o detenerse la tasa de infusión continua salvo que mejore la toxicidad. Deben administrarse dosis en aumento a grupos de pacientes hasta aproximadamente 60 % de pacientes que muestran un Grado III o IV de toxicidad no aceptable en cualquier categoría. Las dosis que tienen 2/3 de este valor se definen como las dosis seguras.

Por supuesto, antes del tratamiento debe realizarse una exploración física, mediciones del tumor y ensayos de laboratorio, y a intervalos de hasta 1 mes después. Los ensayos de laboratorio deben incluir recuentos de sangre entera, creatinina en suero, creatinina quinasa, electrolitos, urea, nitrógeno, SGOT, bilirrubina, albúmina y proteína sérica total. Las muestras de suero tomadas 60 días después del tratamiento deben evaluarse por radioinmunoensayo para detectar la presencia de la construcción administrada, y de los anticuerpos contra cualquier parte de la misma. Los análisis inmunológicos de los sueros, usando cualquier ensayo convencional, tal como, por ejemplo, un ELISA o RIA, permitirán evaluar las propiedades farmacocinéticas y eliminación de los agentes terapéuticos.

Para evaluar las respuestas antitumorales, los pacientes deben examinarse a partir de 48 horas a 1 semana y de nuevo 30 días después de la última infusión. Cuando existe una enfermedad palpable, deben medirse dos diámetros perpendiculares de todas las masas diariamente durante el tratamiento, al cabo de 1 semana después de finalizar la terapia y a los 30 días. Para medir una enfermedad no palpable, deben realizarse escáneres CT en serie a intervalos de 1 cm a lo largo del tórax, abdomen y pelvis al cabo de 48 horas a 1 semana y de nuevo a los 30 días. Las muestras de tejidos también deben evaluarse histológicamente y/o por citometría de flujo usando biopsias de los sitios enfermos o incluso sangre o muestras de fluidos si fuera apropiado.

Las respuestas clínicas pueden definirse con mediciones aceptables. Por ejemplo, una respuesta completa puede definirse por la desaparición de todo el tumor medible 1 mes después del tratamiento. Mientras que una respuesta parcial puede definirse mediante una reducción del 50 % o mayor de la suma de los productos de diámetros perpendiculares de todos los nódulos tumorales evaluables 1 mes después del tratamiento, sin sitios tumorales que

muestran dilatación. De manera similar, una respuesta mixta puede definirse mediante una reducción del producto de diámetros perpendiculares de todas las lesiones medibles al 50 % o mayor 1 mes después del tratamiento, con progresión en uno o más sitios.

5 A la luz de los resultados de los ensayos clínicos, tales como los descritos anteriormente, puede formularse un régimen de tratamiento incluso más preciso. Aun así, puede ser necesario efectuar alguna variación en la dosificación posteriormente dependiendo de la afección del sujeto que vaya a tratarse. El médico responsable de la administración podrá, a la luz de la presente divulgación, determinar la dosis apropiada para el sujeto individual. Dicha optimización y ajuste se realiza de habitualmente en la técnica y de ninguna manera refleja una cantidad de experimentación indebida.

10 **M. Terapias de combinación tumorales**

Los métodos de tratamiento de la presente invención pueden combinarse con cualquier otro método generalmente empleado en el tratamiento del tumor, enfermedad o trastorno particular que presente el paciente. Siempre que se sepa que una estrategia terapéutica particular no es perjudicial para el propio estado del paciente y no interaccione significativamente con el tratamiento de la invención, se contempla su combinación con la presente invención.

15 También se contempla la terapia de combinación para enfermedades no neoplásicas. Un ejemplo particular de este tipo es la hiperplasia prostática benigna (BPH), que puede tratarse en combinación con otros tratamientos actualmente practicados en la técnica. Por ejemplo, el direccionamiento de inmunotoxinas a marcadores localizados dentro de BPH, tal como PSA.

20 En relación con el tratamiento de tumores sólidos, la presente invención puede usarse en combinación con estrategias clásicas, tales como cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia con citocinas, antiangiogénesis y similar. Por lo tanto la invención proporciona terapias combinadas en las que una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo se usa simultáneamente con cirugía o radioterapia, o antes, o después de cirugía o radioterapia; o se administra a los pacientes, antes o después, agentes convencionales quimioterapéuticos o radioterapéuticos, citocinas, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis, inmunotoxinas dirigidas o coagulandos o similares.

25 Anteriormente se han descrito muchos ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados en relación con los aspectos de los conjugados de la presente invención. Cualquiera de los agentes inicialmente descritos para su uso como una parte de un conjugado terapéutico también puede usarse individualmente, en las terapias de combinación de la presente invención.

30 En términos de cirugía, puede realizarse cualquier intervención quirúrgica en combinación con la presente invención. En relación con radioterapia, se contempla cualquier mecanismo para inducir daños en el ADN localmente dentro de las células tumorales, tales como radiación γ , rayos X, radiación UV, microondas e incluso emisiones electrónicas y similares. También se contempla la liberación directa de radioisótopos de células tumorales y esto puede usarse junto con un anticuerpo de direccionamiento u otros medios de direccionamiento.

35 El uso general de combinaciones de sustancias en el tratamiento del cáncer es muy conocido. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 5.710.134 desvela componentes que inducen necrosis en tumores en combinación con sustancias o "profármacos" no tóxicos. Las enzimas que se liberan por procesos necróticos escinden el "profármaco" no tóxico en el "fármaco" tóxico, lo que conduce a la muerte de las células tumorales. Además, la patente de Estados Unidos nº 5.747.469 desvela el uso combinado de vectores víricos que codifican p53 y agentes que dañan el ADN. Cualquiera de dichas estrategias similares puede usarse con la presente invención.

40 Cuando uno o más agentes se usan en combinación con una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la presente invención, no es necesario que los resultados combinados sean aditivos a los de los efectos observados cuando cada tratamiento se realiza por separado. Aunque generalmente como mínimo son deseables los efectos aditivos, cualquier efecto antitumoral aumentado por encima de una de más terapias sencillas debe ser beneficioso. Además, no es necesario en particular que el tratamiento combinado presente efectos sinérgicos, aunque por

45 supuesto esto es posible y ventajoso.

M1. Selección de segundos agentes anticancerosos

50 El "agente terapéutico primario" de la presente invención, como se usa en el presente documento, es una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo o conjugado de los mismos. Los "agentes terapéuticos secundarios", tal y como se usa en el presente documento, son agentes terapéuticos secundarios o agentes anticancerosos distintos, es decir, agentes terapéuticos o agentes anticancerosos, "distintos" del agente terapéutico primario. En las terapias de combinación de la presente invención puede usarse cualquier agente terapéutico secundario. Además, pueden seleccionarse agentes terapéuticos secundarios o "agentes anticancerosos secundarios" con vistas a conseguir efectos aditivos, más que aditivos y posiblemente sinérgicos, de acuerdo con la siguiente orientación.

55 Para la práctica de la terapia antitumoral combinada, simplemente se podría administrar a un animal o a un paciente una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la presente invención en combinación con otro, es decir, un segundo agente anticanceroso, distinto, de una manera eficaz para dar como resultado sus acciones antitumorales combinadas en el animal o paciente. Por lo tanto los agentes deberían proporcionarse en cantidades eficaces y

5 durante periodos de tiempo eficaces para dar como resultado su presencia combinada dentro del tumor o sistema vascular tumoral y sus acciones combinadas en el entorno tumoral. Para conseguir este objetivo, los agentes terapéuticos primarios de la presente invención y los agentes anticancerosos secundarios, distintos pueden administrarse al animal sustancialmente de manera simultánea, bien en una sola composición, o como dos composiciones distintas usando diferentes vías de administración.

10 Como alternativa, una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la presente invención puede preceder al, o ir después del, segundo agente anticanceroso, distinto, por ejemplo, a intervalos que varían de minutos a semanas. En determinadas realizaciones, cuando los agentes terapéuticos primarios de la presente invención y los agentes anticancerosos secundarios, distintos, se aplican por separado al animal, se podría garantizar que no prescriba un periodo de tiempo significativo entre el tiempo de cada administración, de tal manera que cada agente pueda aun ejercer un efecto ventajosamente combinado en el tumor. En dichos casos, se contempla que el tumor se pueda poner en contacto con ambos agentes en un tiempo de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente una semana entre si y, más preferentemente, al cabo de aproximadamente 12-72 horas entre si, prefiriéndose más un tiempo de retardo de solo aproximadamente 12-48 horas.

15 En función de determinados criterios, incluyendo los indicados más adelante, pueden seleccionarse agentes terapéuticos secundarios para terapias de combinación separadas en el tiempo. Sin embargo, una preferencia para seleccionar uno o más agentes anticancerosos secundarios, distintos, para una administración previa o posterior, no excluye su uso en una administración sustancialmente simultánea si se desea.

20 Los agentes anticancerosos secundarios, distintos para administración "antes de" los agentes terapéuticos primarios de la presente invención, y diseñados para conseguir efectos aumentados y posiblemente sinérgicos, incluyen agentes que inducen la expresión de aminofosfolípidos o fosfolípidos aniónicos dentro del sistema vascular tumoral. Por ejemplo, agentes que estimulan la producción de calcio localizada, activan transportadores de membrana que desplazan la PS y otros fosfolípidos a la superficie externa de la membrana plasmática, producen daños en el endotelio tumoral, causan cambios preapoptóticos y/o inducen la apoptosis en el endotelio tumoral generalmente darán como resultado una expresión aumentada de aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos. Los ejemplos de dichos agentes son docetaxel y paclitaxel. Los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos pueden después actuar como dianas usando una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, amplificando de este modo el efecto terapéutico global, y también proporcionando un ataque aumentado mediante efectores de los hospedadores (complemento, ADCC, fagocitosis mediada por anticuerpo, CDC).

30 Los fármacos que tienen selectividad angiogénica, remodelando o activando células endoteliales, tales como las presentes en vasos sanguíneos tumorales, pero no en vasos sanguíneos normales, en reposo, también pueden usarse para causar selectivamente la exposición de PS y otros fosfolípidos sobre la superficie de las células endoteliales tumorales. Las combrestatinas y el docetaxel son ejemplos de dichos agentes. Esto conduciría de nuevo a aumentar la unión del anticuerpo y a potenciar el inicio de mecanismos efectores del hospedador.

35 En segundo lugar, distintos agentes anticancerosos seleccionados para su administración "posterior a" los agentes terapéuticos primarios de la presente invención y diseñados para conseguir efectos aumentados y potencialmente sinérgicos, incluyen agentes que se benefician de los efectos de los agentes terapéuticos primarios. La construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la presente invención causará la destrucción tumoral. Por consiguiente, los agentes anticancerosos distintos efectivos secundarios para su administración posterior incluyen agentes antiangiogénicos que inhiben la metástasis; agentes que se dirigen a células tumorales necróticas, tales como anticuerpos específicos para antígenos intracelulares que se hacen accesibles en células malignas *in vivo* (Patentes de Estados Unidos nº 5.019.368, 4.861.581 y 5.882.626); y agentes quimioterapéuticos e inmunconjugados de celulares antitumorales, que atacan cualquiera de las células tumorales que pueden sobrevivir en la periferia.

45 En algunas situaciones, puede ser deseable ampliar el periodo de tiempo para el tratamiento significativamente, en el que pasan varios (2, 3, 4, 5, 6 o 7), varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) o incluso varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre las administraciones respectivas. Esto sería beneficioso en circunstancias en las que un tratamiento está destinado a destruir sustancialmente el tumor, tal como el agente terapéutico primario de la presente invención y otro tratamiento está destinado a impedir las micrometástasis o el recrecimiento tumoral, tal como la administración de un agente antiangiogénico. Los agentes antiangiogénicos deben administrarse en un tiempo cuidadoso después de la cirugía, sin embargo, para permitir la curación eficaz de las heridas. Los agentes antiangiogénicos pueden después administrarse durante toda la vida del paciente.

55 También se contempla que pueda utilizarse más de una administración del agente terapéutico primario o del segundo agente anticanceroso distinto. El agente terapéutico primario o el segundo agente anticanceroso distinto pueden administrarse de manera intercambiable, en días o semanas alternos; o puede darse una secuencia de tratamiento de un agente, seguido de una secuencia de otro tratamiento. En cualquier caso, para lograr la regresión tumoral usando una terapia combinada, todo lo que se necesita es administrar ambos agentes en una cantidad eficaz combinada para ejercer un efecto antitumoral, independientemente de los instantes de la administración.

Ya se administre de manera sustancialmente simultánea o secuencial, la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo y los agentes terapéuticos de la presente invención, pueden administrarse en combinación con uno o más agentes o

fármacos quimioterapéuticos. Los fármacos quimioterapéuticos pueden destruir células tumorales proliferativas, potenciar las áreas necróticas creadas por el tratamiento global.

Por tanto los fármacos pueden potenciar la acción trombótica de los agentes terapéuticos primarios de la invención.

5 La mayoría de los fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer son selectivos para las células en división, oxigenadas. Estos tienen ventajas en la terapia combinada ya que el fármaco quimioterapéutico actúa sobre diferentes dianas a las de los agentes terapéuticos primarios de la invención, lo que da lugar a un efecto antivascolar o antitumoral más completo. Por ejemplo, los fármacos quimioterapéuticos son activos de manera selectiva contra células tumorales oxigenadas que se dividen rápidamente en la periferia del tumor, mientras que los agentes de la invención actúan principalmente en vasos o células tumorales en el núcleo del tumor "estresado", en el que abundan las especies de oxígeno reactivas activadoras. Los fármacos antiangiogénicos son selectivos para vasos angiogénicos bien oxigenados en la periferia del tumor también serían eficaces en combinación, ya que los agentes de la invención actúan en los vasos quiescentes relativamente hipóxicos en el núcleo del tumor.

15 Al inducir la formación de trombos en los vasos tumorales, los agentes terapéuticos primarios de la presente invención también pueden potenciar la acción de los fármacos quimioterapéuticos reteniendo o atrapando los fármacos dentro del tumor. Los agentes quimioterapéuticos por tanto quedan retenidos dentro del tumor, mientras que el resto del fármaco se elimina del organismo. Por lo tanto, las células tumorales se exponen a una mayor concentración de fármaco durante un periodo de tiempo más prolongado. Este atrapamiento de fármaco dentro del tumor hace posible reducir la dosis del fármaco, haciendo que el tratamiento sea más seguro así como más eficaz.

20 Los fármacos adicionales para su uso combinado en la presente invención son aquellos que actúan sobre células que se "sensibilizan" contra el fármaco mediante la acción del agente terapéutico primario, de tal manera que se necesitan dosis reducidas del segundo fármaco para conseguir este efecto antitumoral. Por ejemplo, esto podría suceder cuando se ejerce un componente principal de la acción del fármaco secundario sobre los vasos tumorales y los agentes de la invención sensibilizan a las células frente al fármaco. Esto mismo es verdadero cuando el agente terapéutico primario de la invención sensibiliza a las células tumorales contra a un segundo fármaco, bien directamente o mediante la estimulación de la liberación de citocinas.

25 Otros agentes contra el cáncer secundarios adecuados para la terapia de combinación son aquellos que potencian adicionalmente la actividad de las células efectoras hospedadoras, por ejemplo, inhibiendo selectivamente la actividad de los componentes inmunosupresores del sistema inmunitario. Dichos agentes permiten que los agentes terapéuticos primarios de la invención, que estimulan el ataque por células efectoras como parte de su mecanismo, actúen de manera más agresiva. Un ejemplo de dicho agente es docetaxel.

30 Aunque no es necesario un entendimiento del mecanismo, o mecanismos, de acción exactos de los agentes terapéuticos primarios para llevar a la práctica el tratamiento de la invención, los datos y deducciones razonadas concernientes a dichos mecanismos pueden usarse para seleccionar agentes anticancerosos secundarios para su uso combinado en la presente invención. La eficacia de la terapia de combinación seleccionada, a su vez, confirma los datos originales y los mecanismos de acción propuestos, y también conduce a categorías preferidas de segundos agentes contra el cáncer para la práctica de la terapia de combinación.

35 Se prefieren fármacos que inducen apoptosis para su uso en las terapias de combinación. El docetaxel, por ejemplo, induce la apoptosis y por lo tanto la exposición de PS uniéndose a microtúbulos y alterando la mitosis celular (Hotchkiss *et al.*, 2002). En el presente documento se demuestra que el tratamiento de células endoteliales, que recubren los vasos sanguíneos tumorales y de las células tumorales con docetaxel a concentración subclínicas induce la expresión de PS en la superficie celular, demostrado por una fuerte unión del anticuerpo 3G4 *in vitro*.

40 Los autores de la presente invención también han determinado que los efectos antitumorales de la invención incluyen el aumento mediado por el dominio Fc de las funciones inmunoefectoras, como se muestra mediante el aumento de la fagocitosis mediada por anticuerpos. Por lo tanto, se producirán otras funciones mediadas por el dominio Fc, tales como ADCC, CDC, estimulación de la producción de citocinas, y dichos mecanismos en combinación. Esto también es relevante para el docetaxel, ya que otros estudios han demostrado que el tratamiento de los pacientes con cáncer de mama con docetaxel da lugar a aumentos en suero de IFN- γ , IL-2, IL-6 y niveles de citocinas de GM-CSF, aumentando las respuestas inmunitarias antitumorales en estos pacientes potenciando la actividad de linfocitos citolíticos (NK *natural killer*) y linfocitos citolíticos activados por linfocinas (LAK) (Tsavaris *et al.*, 2002).

45 Por lo tanto, los inventores llegaron a la conclusión de que docetaxel inducirá la expresión de PS y la unión de la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo administrado y también potencia las actividades de los efectores inmunitarios que miden los efectos antitumorales. Basándose en las anteriores consideraciones, los inventores han demostrado que la combinación del anticuerpo 3G4 con docetaxel era significativamente superior a docetaxel o a 3G4 solo en ratones portadores de xenoinjertos de cáncer de mama MDA-MB-435 humanos ortotópicos (Ejemplo XX).

55 Por consiguiente, el docetaxel y otros agentes quimioterapéuticos que inducen la apoptosis son agentes preferidos para su uso en los tratamientos de combinación de la presente invención. Las combinaciones de una construcción,

receptorcuerpo o betacuerpo con agentes quimioterapéuticos o fármacos que inducen la apoptosis, tales como docetaxel deben atacar sinérgicamente a las células endoteliales vasculares tumorales y a los compartimentos celulares tumorales, dando lugar no solo a una eficacia del tratamiento potenciada, sino también a una menor toxicidad. Estas combinaciones se contemplan para su uso en el tratamiento del cáncer de mama, particularmente la combinación de quimioterapia metronómica usando docetaxel con un anticuerpo de la presente invención.

M2. Endotoxina

Pueden usarse endotoxinas y derivados de endotoxinas destoxificados en el tratamiento de combinación, preferentemente a dosis bajas (Publicación PCT nº WO 03/028840). Se dispone de diversas endotoxinas destoxificadas, que se prefieren para su uso en animales y particularmente para su uso en seres humanos. Las endotoxinas destoxificadas y refinadas y sus combinaciones se describen en las Patentes de Estados Unidos nº 4.866.034; 4.435.386; 4.505.899; 4.436.727; 4.436.728; 4.505.900.

El derivado no tóxico monofosforil lípido A (MPL) es un ejemplo de una endotoxina destoxificada que puede usarse en la presente invención. Se sabe que el MPL es inocuo para seres humanos; ensayos clínicos usando MPL como adyuvante han demostrado que 100 µg/m² era inocuo para el uso en seres humanos, incluso en uso de tipo ambulatorio.

M3. Citocinas

Se ha demostrado que la terapia con citocinas es un acompañamiento eficaz para los regímenes terapéuticos combinados. Pueden emplearse diversas citocinas en las estrategias combinadas de la presente invención. Los ejemplos de citocinas incluyen IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TGF-β, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNFα, TNFβ, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-α, IFN-β, IFN-γ. Las citocinas se administran de acuerdo con regímenes convencionales, coherentes con indicaciones clínicas tales como la afección del paciente y la toxicidad relativa de la citocina. Las uteroglobinas también pueden usarse para prevenir o inhibir las metástasis (Patente de Estados Unidos nº 5.696.092).

M4. TNFα e inductores de TNFα

El TNFα y los inductores de TNFα también pueden usarse en combinación con la presente invención. El TNFα aumenta la permeabilidad vascular y es por lo tanto útil para facilitar la penetración de agentes contra el cáncer en el tumor. Aunque la localización no representa un problema de modo alguno en el direccionamiento de PS y fosfolípidos aniónicos, como en la presente invención, el uso combinado de TNFα puede facilitar el acceso de otros agentes quimioterapéuticos e inmunocombinados contra el tumor, incluso aumentar la unión de los anticuerpos de la invención a células tumorales bastante distantes.

También pueden usarse niveles bajos de endotoxina, antagonistas de Rac1, tales como un adenovirus atenuado o modificado por ingeniería genética, DMXAA (y FAA), CM101 y talidomida. Los antagonistas de Rac1 pueden usarse en el tratamiento combinado de la presente invención, ya que aproximadamente 5000 partículas de ADN por célula causan la regulación positiva de TNF independiente de CD14 (Sanlioglu *et al.*, 2001). También pueden usarse CM101, talidomida y DMXAA en combinación con la misma, a dosis estándar o reducida.

M5. Agentes quimioterapéuticos

Independientemente del mecanismo (o mecanismos) subyacente, pueden usarse una variedad de agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinados desvelados en el presente documento. Los agentes quimioterapéuticos contemplados para el uso combinado incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, taxol, vinblastina, etopósido (VP-16), adriamicina, 5-fluorouracilo (5FU), camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, combretastatina(s), más particularmente docetaxel (taxotere), cisplatino (CDDP), ciclofosfamida, doxorubicina, metotrexato, paclitaxel y vincristina y derivados y profármacos de los mismos.

Como entenderán los expertos habituales en la técnica, las dosis adecuadas de los agentes quimioterapéuticos incluyen aquellas ya empleadas en terapias clínicas en las que los agentes quimioterapéuticos se administran en solitario o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, ahora son posibles dosis más bajas debido a las ventajas proporcionadas por la presente invención. Solo a modo de ejemplo, pueden usarse agentes tales como cisplatino y otros alquilantes de ADN. El cisplatino se ha utilizado ampliamente para tratar el cáncer, con dosis eficaces usadas en aplicaciones clínicas de 20 mg/m² durante 5 días cada tres semanas durante un total de tres ciclos. El cisplatino no se ha absorbe por vía oral y debe por lo tanto administrarse mediante inyección intravenosa, subcutánea, intratumoral o intraperitoneal.

Los agentes útiles adicionales incluyen compuestos que interfieren con la replicación del ADN, la mitosis, la segregación cromosómica y/o la actividad de tubulina. Dichos compuestos quimioterapéuticos incluyen adriamicina, también conocidos como doxorubicina, etopósido, verapamilo, podofilotoxina (o podofilotoxinas), combretastatina (o combrestatinas) y similares. Usados ampliamente en el entorno clínico para el tratamiento de neoplasmas, estos compuestos se administran a través de inyecciones en embolada por vía intravenosa a dosis que varían entre 25-75 mg/m² a intervalos de 21 días para adriamicina, a 35-50 mg/m² para etopósido por vía intravenosa o el doble de la

dosis intravenosa por vía oral.

5 También pueden usarse agentes que alteran la síntesis y fidelidad de precursores polinucleotídicos. Son particularmente útiles los agentes que se han sometido a ensayos exhaustivos y están fácilmente disponibles. Como tales, los agentes tales como 5-fluorouracilo (5-FU) se usan preferentemente por el tejido neoplásico, haciendo que este agente sea particularmente útil para el direccionamiento a células neoplásicas. Aunque es bastante tóxico, el 5-FU es aplicable en una amplia variedad de transportadores, incluyendo administración tópica, aunque se usa comúnmente la administración intravenosa con dosis que varían de 3 a 15 mg/kg/día.

10 Los agentes quimioterapéuticos ejemplares que son útiles junto con la terapia combinada se indican en la **Tabla D**. Cada uno de los agentes indicados en el presente documento son ejemplares y en modo alguno limitantes. El experto en la técnica se dirige a "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, capítulo 33, en particular páginas 624-652. Alguna variación en la dosificación será necesaria que se produzca dependiendo de la afección del sujeto a tratar. El médico responsable de la administración podrá determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

TABLA D

15 **Agentes quimioterapéuticos útiles en enfermedad neoplásicas**

Clase	Tipo de agente	Denominaciones comunes (otros nombres)	Enfermedad
<i>Agentes Alquilantes</i>	Mostazas de Nitrógeno	Mecloretamina (HN ₂)	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin
		Ciclofosfamida Ifosfamida	Leucemias linfocíticas aguda y crónica, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, mama, ovario, pulmón, tumor de Wilms, cuello uterino, testículos, sarcomas de tejido blando
		Melfalán (L-sarcolisina)	Mieloma múltiple, mama, ovario
		Clorambucilo	Leucemia linfocítica crónica, macroglobulinemia primaria, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin
	Etileniminas y Metilmelaminas	Hexametilmelamina	Ovario
		Tiotepa	Vejiga, mama, ovario
	Alquil Sulfonatos	Busulfán	Leucemia granulocítica crónica
	Nitrosoureas	Carmustina (BCNU)	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, tumores cerebrales primarios, mieloma múltiple, melanoma maligno
		Lomustina (CCNU)	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, tumores cerebrales primarios, pulmón microcítico
		Semustina (metil-CCNU)	Tumores cerebrales primarios, estómago, colon
		Estreptozocina (estreptozotocina)	Insulinoma pancreático maligno, carcinoide maligno
	Triacinas	Dacarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazolcarboxamida)	Melanoma maligno, enfermedad de Hodgkin, sarcomas de tejido blando

Clase	Tipo de agente	Denominaciones comunes (otros nombres)	Enfermedad
<i>Antimetabolitos</i>	Análogos del Ácido Fólico	Metotrexato (ametofterina)	Leucemia linfocítica aguda, coriocarcinoma, micosis fungoide, mama, cabeza y cuello, pulmón, sarcoma osteogénico
	Análogos de Pirimidina	Fluouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU) Floxuridina (fluorodesoxiuridina; FUDR)	Mama, colon, estómago, páncreas, ovario, cabeza y cuello, vejiga urinaria, lesiones dérmicas premalignas (tóxicas)
		Citarabina (arabinósido de citoxina)	Leucemias granulocítica aguda y linfocítica aguda
		Mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP)	Leucemia linfocítica aguda, granulocítica aguda y leucemia granulocítica crónica
<i>Antimetabolitos, continúa</i>	Análogos de Purina e Inhibidores Relacionados	Tioguanina (6-tioguanina; TG)	Leucemia granulocítica aguda linfocítica aguda y granulocítica aguda,
		Pentostatina (2-desoxicoformicina)	tricoleucemia, micosis fungoide, leucemia linfocítica crónica,
<i>Productos Naturales</i>	Alcaloides de la Vinca	Vinblastina (VLB)	enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, mama, testículos
		Vincristina	Leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma, tumor de Wilms, rhabdomiosarcoma, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, pulmón microcítico
	Epipodofilotoxinas	Etopósido Tertipósido	Testículos, pulmón microcítico y otros pulmón, mama, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, leucemia granulocítica aguda, sarcoma de Kaposi
	Antibióticos	Dactinomicina (actinomicina D)	Coriocarcinoma, tumor de Wilms, rhabdomiosarcoma, testículos, sarcoma de Kaposi
		Daunorrubicina (daunomicina; rubidomicina)	Leucemia granulocítica aguda y linfocítica aguda
		Doxorrubicina	Sarcoma de tejido blando osteogénico y otros sarcomas; enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, leucemias agudas, mama, genitourinario, tiroides, pulmón, estómago, neuroblastoma
		Bleomicina	Testículo, cabeza y cuello, piel, esófago, pulmón y tracto genitourinario; enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin

Clase	Tipo de agente	Denominaciones comunes (otros nombres)	Enfermedad
<i>Productos Naturales, continuados</i>	Antibióticos, continuados	Plicamicina (mitramicina)	Testículos, hipercalcemia maligna
		Mitomicina (mitomicina C)	Estómago, cuello uterino, colon, mama, páncreas, vejiga, cabeza y cuello
	Enzimas	L-Asparaginasa	Leucemia linfocítica aguda
	Modificadores de la Respuesta Biológica	Interferón alfa	Tricoleucemia, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinoide, células renales, ovario vejiga, linfomas no Hodgkin, micosis fungoides, mieloma múltiple, leucemia granulocítica crónica
<i>Mezclas de Agentes</i>	Complejos de Coordinación de Platino	Cisplatino (<i>cis</i> -DBP) Carboplatino	Testículos, ovario, vejiga, cabeza y cuello, pulmón, tiroides, cuello uterino, endometrio, neuroblastoma, sarcoma osteogénico
	Antracenediona	Mitoxantrona	Leucemia granulocítica aguda, mama
	Urea Sustituida	Hidroxiurea	Leucemia granulocítica crónica, policitemia vera, trombocitosis esencial, melanoma maligno
	Derivado de Metil Hidrazina	Procarbazina (N-metilhidrazina, MIH)	Enfermedad de Hodgkin
	Supresor Adrenocortical	Mitotano(<i>o,p'</i> -DDD)	Corteza adrenal
Aminoglutetimida		Mama	
<i>Hormonas y Antagonistas</i>	Adrenocorticoesteroides	Prednisona (diversas otras preparaciones equivalentes disponibles)	Leucemia linfocítica crónica y aguda, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin y mama
	Progestinas	Caproato de Hidroxiprogesterona Acetato de Medroxiprogesterona Acetato de Megestrol	Endometrio, mama
	Estrógenos	Dietilstilbestrol Etil estradiol (otras preparaciones disponibles)	Mama, próstata
	Antiestrógeno	Tamoxifeno	Mama
	Andrógenos	Propionato de testoreona Fluoximesterona (otras preparaciones disponibles)	Mama
	Antiandrógeno	Flutamida	Próstata
Análogo de la hormona liberadora de gonadotropina	Leuprolida	Próstata	

M6. Antiangiogénesis

El término “angiogénesis” se refiere a la generación de nuevos vasos sanguíneos, generalmente en un tejido u

5 órgano. En condiciones fisiológicas normales, los seres humanos o los animales sufren angiogénesis únicamente en situaciones específicas restringidas. Por ejemplo, la angiogénesis se observa normalmente en la curación de heridas, desarrollo fetal y embrionario y formación del *corpus luteum*, endometrio y placenta. Sin embargo, nuevas pruebas muestran que la angiogénesis es importante en determinadas situaciones normales, tales como en el tejido adrenal, próstata y ovarios. Los agentes terapéuticos de la presente invención, en los cuales la antiangiogénesis no es el único modo de acción, tienen por lo tanto ventajas sobre las terapias antiangiogénicas destacadas, tales como el anticuerpo A4.6.1 (Brem, 1998; Baca *et al*, 1997; Presta *et al*, 1997), en tanto que la angiogénesis deseable o “fisiológica” no se inhibirá cuando se use en la presente invención.

10 La angiogénesis no controlada (persistente y/o no regulada) está relacionada con diversas patologías y se produce durante el desarrollo y la metástasis tumoral. Se cree que la angiogénesis tanto controlada como no controlada procede de una manera similar. Las células endoteliales y pericitos rodeadas por una membrana basal, forman los vasos sanguíneos capilares. La angiogénesis comienza con la erosión de la membrana basal por enzimas liberadas por las células endoteliales y leucocitos. Las células endoteliales, que recubren el lumen de los vasos sanguíneos, sobresalen después a través de la membrana basal. Los estimulantes angiogénicos inducen a las células endoteliales a migrar a través de la membrana basal erosionada. Las células en migración forman un “brote” fuera del vaso sanguíneo parental, donde las células endoteliales se someten a mitosis y proliferan. Los brotes endoteliales se fusionan entre sí para formar bucles capilares creando nuevos vasos sanguíneos.

15 A pesar de las nuevas pruebas de que la angiogénesis se requiere en algunos tejidos normales, las terapias antiangiogénicas son aún importantes en el tratamiento de tumores y otras enfermedades. Las terapias antiangiogénicas están por lo tanto destinadas a su uso en tratamientos de combinación de la presente invención. La combinación de una dosis baja, relativamente frecuente de un agente terapéutico de la presente invención en combinación con un agente que inhibe la angiogénesis está particularmente contemplada. Los agentes antiangiogénicos ejemplares que son útiles junto con la terapia combinada se indican anteriormente (en relación con los inmunoconjugados). Puede usarse uno cualquiera o más de dichos agentes, incluyendo los de la **Tabla B** en terapia de combinación con la invención. Actualmente se prefieren la angioestatina, endostatina, vasculoestatina, canstatina y maspina.

20 Muchos agentes contra el cáncer conocidos también tienen un efecto antiangiogénico como parte de su mecanismo de acción. Estos agentes, tal como se ilustra por los de la **Tabla E**, se contemplan particularmente para su uso en los aspectos de terapia de combinación de la presente invención (estos pueden también conjugarse con una construcción receptorcuerpo o betacuerpo de la invención, tal como se ha descrito anteriormente).

TABLA E

Agentes anticancerosos con actividad antiangiogénica

Clase o Tipo de Agente	Ejemplos
Alquilantes	Ciclofosfamida, edelfosina, estramustina, melfalán
Antimetabolitos	Fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, UFT, tegafur, uracilo, citarabina
Antibióticos Antitumorales	Bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, mitomicina, mitoxantrona
Inhibidores de Topoisomerasa	Camptotecina, irinotecán, etopósido, topotecán
Taxanos	Docetaxel, paclitaxel
Alcaloides de la Vinca	Vinblastina, vincristina
Mezclas	Cisplatino, octreótido

35 Además, el anticuerpo LM609 contra la integrina $\alpha_v\beta_3$ también induce regresiones tumorales y puede usarse en terapias de combinación. Los antagonistas de integrina $\alpha_v\beta_3$, tales como LM609, inducen la apoptosis de células endoteliales angiogénicas dejando sin afectar a los vasos sanguíneos quiescentes. LM609 u otros antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ también trabajan inhibiendo la interacción de $\alpha_v\beta_3$ y MMP-2, una enzima proteolítica que se piensa que desempeña una función importante en la migración de células endoteliales y fibroblastos.

40 La apoptosis del endotelio angiogénico por LM609 tiene un efecto en cascada sobre el resto de la red vascular. La inhibición de la capacidad de respuesta de la red vascular tumoral a la señal de expansión del tumor puede, de hecho, iniciar el colapso parcial o total de la red, provocando la muerte de las células tumorales. Es posible que la endostatina y la angioestatina funcionen de una manera similar. El hecho de que LM609 no afecte a vasos quiescentes pero sea capaz de causar regresión tumoral sugiere fuertemente que no es necesario que se usen como diana del tratamiento todos los vasos sanguíneos en un tumor para obtener un efecto antitumoral.

También pueden emplearse anticuerpos contra angiogenina, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos nº 5.520.914. Dado que la FGF está vinculada con la angiogénesis, también pueden usarse inhibidores de FGF. Determinados ejemplos son los compuestos que tienen N-acetilglucosamina alternando en secuencia con ácido urónico 2-O-sulfatado como sus unidades repetición principales, incluyendo los glucosaminoglucanos, tales como el sulfato de arcarán. Dichos compuestos se describen en la Patente de Estados Unidos nº 6.028.061 y pueden usarse en combinación con la misma.

M7. Inhibidores de VEGF

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

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

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

En determinadas realizaciones se preferirán anticuerpos bloqueantes contra VEGF, particularmente por su sencillez. Se ha observado que los anticuerpos monoclonales contra VEGF inhiben el crecimiento de xenoinjertos tumorales humanos y la formación de ascitis en ratones (Kin *et al.*, 1993; Mesiano *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998a; 1998b; Borgstrom *et al.*, 1996; 1998). El anticuerpo A4.6.1 es un anticuerpo anti-VEGF de alta afinidad que puede bloquear la unión de VEGF tanto a VEGFR1 como a VEGFR2 (Kim *et al.*, 1992; Weismann *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 1998; Keyt *et al.*, 1996). A4.6.1 se ha humanizado recientemente mediante técnicas de presentación de fagos monovalentes y actualmente está en ensayos clínicos en Fase I como un agente contra el cáncer (Brem, 1998; Baca *et al.*, 1997; Presta *et al.*, 1997).

La mutagénesis mediante alanina y la cristalografía de rayos X de VEGF unido por el fragmento Fab de A4.6.1 mostró que el epítipo de VEGF que se une a A4.6.1 está centrado aproximadamente en 89-94 aminoácidos. Este dato estructural demuestra que A4.6.1 inhibe competitivamente VEGF de la unión a VEGFR2, pero inhibe VEGF de la unión a VEGFR1 más probablemente por impedimento estérico (Muller *et al.*, 1998; Keyt *et al.*, 1996).

A4.6.1 puede usarse en combinación con la presente invención. Sin embargo, actualmente se prefiere un nuevo anticuerpo denominado 2C3 (4545), ya que bloquea selectivamente la interacción de VEGF con solamente uno de los dos receptores de VEGF. 2C3 inhibe el crecimiento mediado por VEGF de células endoteliales, tiene actividad antitumoral fuerte y bloquea selectivamente la interacción de VEGF con VEGFR2 (KDR/Fik-1), pero no con VEGFR1 (FLT-1). Por otro lado A4.6.1, 2C3 permite la inhibición específica de la angiogénesis inducida por VEGFR2 sin inhibición concomitante de quimiotaxis de macrófagos (mediada por VEGFR1) y por tanto se contempla que es un agente terapéutico inocuo. Las Patentes de Estados Unidos nº 6.342.219, 6.342.221, 6.416.758 y 6.416.758, se identifican específicamente para los fines de incluso la descripción del anticuerpo 2C3 y sus usos en terapia antiangiogénica e inhibición de VEGF.

M8. Agentes inductores de apoptosis

Los agentes terapéuticos de la presente invención también se combinan preferentemente con métodos de tratamiento que inducen la apoptosis en cualquiera de las células dentro del tumor, incluyendo células tumorales y células endoteliales vasculares tumorales. Los agentes ejemplares que inducen la apoptosis se indican anteriormente (en relación con los inmunconjugados). Cualquiera de uno o más de dichos agentes inductores de la apoptosis puede usarse en las terapias de combinación de la presente invención, sin desear quedar ligado a un anticuerpo de la invención.

Muchos agentes anticancerosos conocidos tienen un efecto inductor de apoptosis como parte de su mecanismo de acción. Estos agentes, como se ilustra por los que se indican en la **Tabla F** se contemplan particularmente para su uso en aspectos de terapia de combinación de la presente invención (estos también pueden conjugarse con anticuerpo de la invención, como se ha descrito anteriormente).

TABLA F

Agentes contra el cáncer que inducen apoptosis

Clases o Tipos de Agente	Ejemplos
Antimetabolitos	Citarabina, fludarabina, 5-fluoro-29-desoxiuridina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato
Agentes reticulantes de ADN	Clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, mostaza de nitrógeno
Agentes Intercalantes	Adriamicina (doxorubicina), mitoxantrona
Venenos de Topoisomerasa II	Etopósido, tenipósido
Agentes Dirigidos a Microtúbulos	Colcemid, colchicina, docetaxel, vincristina
Inhibidores de Quinasa	Flavoperidol, estaurosporina, ST571 (CPG 57148B), UCN-01 (7-hidroxiestaurosporina)
Inhibidores de Farnesil Transferasa	L-739749, L-744832
Hormonas	Glucocorticoides, fenretinida
Agentes de Fragmentación de ADN	Bleomicina
Antagonistas Hormonales	Tamoxifeno, finasterida, agonistas de LHRH
Agentes biológicos	TNF- α , TRAIL, anti-CD20
Inhibidores de la Síntesis de Proteínas	L-asparaginasa, cicloheximida, puromicina, toxina de la difteria
Venenos de Topoisomerasa II	Camptotecina, topotecán

M9. Inmunotoxinas y Coaguligandos

- 5 La presente invención también puede usarse en combinación con otras inmunotoxinas o coaguligandos en los que la parte de direccionamiento se dirige a un marcador de células tumorales, vasculatura tumoral o extremo tumoral. Cualquier agente de dirección puede usarse en el direccionamiento a una célula, vasculatura tumoral o estroma tumoral en estas realizaciones. En las inmunotoxinas, los agentes unidos incluyen agentes anticelulares o citotóxicos, citocinas, agentes radioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis y fármacos antitubulina. En los coaguligandos, los agentes unidos son coagulantes. Las Patentes de Estados Unidos n° 5.855.866, 5.965.132, 6.261.535, 6.051.230, 6.451.312 (inmunotoxinas), 6.093.399, 6.004.555, 5.877.289 y 6.036.955 (coaguligandos) se identifican específicamente para ilustrar dichas construcciones.

M10. ADEPT y terapia con profármacos

- 15 Una construcción receptorcuerpo o betacuerpo de la presente invención también puede usarse junto con profármacos, en los que la construcción receptorcuerpo o betacuerpo está asociada operativamente a un componente activador de profármaco, tal como una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco en una forma más activa solo después de ponerse en contacto con el anticuerpo. Esta tecnología generalmente se denomina "ADEPT" y se describe por ejemplo en los documentos WO 95/13095; WO 97/26918, WO 97/24143, y las Patentes de Estados Unidos n° 4.975.278 y 5.658.568.

- 20 El término "profármaco", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia biológica farmacéuticamente activa que ejerce efectos anticelulares citotóxicos o de otra manera anticelulares reducidos sobre células diana, incluyendo células endoteliales vasculares tumorales en comparación con el fármaco parental sobre el cual se basa. Preferentemente, el profármaco o precursor ejerce un efecto citotóxico o anticelular significativamente reducido o más preferentemente insignificante en comparación con la forma "nativa" o parental. Estos "profármacos" son capaces de activarse o convertirse para producir la forma parental más activa del fármaco.

La capacidad técnica para preparar y usar profármacos existe dentro de la capacidad del experto habitual. Willman *et al.*, (1986) y Stella *et al.*, (1985) cada uno de ellos se identifican especialmente para fines de complementar adicionalmente la descripción y enseñanzas que se refieren a cómo preparar y usar diversos profármacos. Las

- construcciones de profármacos ejemplares que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfato (Patente de Estados Unidos nº 4.975.278), profármacos que contienen tiosulfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos basados en péptidos (Patentes de Estados Unidos nº 5.600.829; 5.587.161; 5.405.990; documento WO 97/07118), profármacos modificados con D aminoácidos, profármacos glucosilados (Patentes de Estados Unidos nº 5.561.119; 5.646.298; 4.904.768, 5.041.424), profármacos que contienen β -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos (Patente de Estados Unidos nº 4.975.278), profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos e incluso profármacos de 5-fluorocitosina (Patente de Estados Unidos nº 4.975.278) y de 5-fluorouridina y similares.
- 5 El tipo de agente terapéutico o farmacocitotóxico que puede usarse en la forma profarmacológica es virtualmente ilimitado. Se preferirán los agentes más citotóxicos para dicha forma de administración, sobre por ejemplo la administración de coagulantes, que es menos preferida para su uso como profármacos. Todo lo que requiere en la formación del profármaco es diseñar la construcción de tal manera que el profármaco esté sustancialmente inactivo y que el fármaco "liberado" o activado tenga una actividad sustancial o al menos suficiente para el fin previsto.
- 10 También se conocen y contemplan diversas mejoras de los profármacos originales para su uso con la misma, tal como se desvela en los documentos WO 95/03830; EP 751.144 (antraciclina); WO 97/07097 (ciclopropilindoles); y documento WO 96/20169. Por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos nº 5.621.002 se describen profármacos con Km reducida que pueden usarse en el contexto de la presente invención. También se conocen la terapia con profármacos que puede realizarse intracelularmente, tal como se ilustra mediante el documento WO 96/03151 y puede llevarse a la práctica con la misma.
- 15 Para su uso en ADEPT, el agente que activa o convierte el profármaco en el fármaco más activo está unido operativamente a un anticuerpo de la invención. El anticuerpo por lo tanto localiza el profármaco que convierte la capacidad dentro del sitio angiogénico o tumoral, de manera que el fármaco activo se produce solamente en dichas regiones y no en la circulación o en tejidos sanos.
- 20 Las enzimas que pueden unirse a los anticuerpos de la invención para funcionar en la activación de profármacos incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina para su uso en combinación con profármacos que contienen fosfato (Patente de Estados Unidos nº 4.975.278); arilsulfatasa para su uso en combinación con profármacos que contienen sulfato (Patente de Estados Unidos nº 5.270.196); peptidasas y proteasas, tales como proteasa de serratina, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasa (Patentes de Estados Unidos nº 5.660.829; 5.587.161; 5.405.990) y catepsinas (incluyendo catepsinas B y L), para su uso en combinación con profármacos basados en péptidos; D-alanilcarboxipeptidasas para su uso en combinación con profármacos modificados con D-aminoácidos; enzimas que escinden hidratos de carbono tales como β -galactosidasa y neuraminidasa para su uso en combinación con profármacos glucosilados (Patentes de Estados Unidos nº 5.561.119; 5.646.298); β -lactamasa para su uso en combinación con profármacos que contienen β -lactama; amidasas de penicilina tal como amidasa de penicilina V (Patente de Estados Unidos nº 4.975.278) o amidasa de penicilina G, para su uso en combinación con fármacos derivatizados en sus nitrógenos amino con fenoxiacetamida o grupos fenilacetamida y desaminasa citosina (Patentes de Estados Unidos nº 5.338.678; 5.545.548) para su uso en combinación con profármacos basados en 5-fluorocitosina (Patente de Estados Unidos nº 4.975.278).

K. Liposomas y agentes terapéuticos recubiertos con anticuerpos

- 40 Las formulaciones liposomales se usan con frecuencia en agentes terapéuticos y farmacéuticos. Sin embargo, la biodistribución de liposomas en estudios iniciales dio a entender que dichas formulaciones no son generalmente aplicables para su uso en seres humanos. Los liposomas se captan rápidamente por las células fagocíticas del sistema retículoendotelial (RES), incluyendo las células fagocíticas mononucleares en circulación y las localizadas en el hígado y bazo. Por tanto, las semividas de circulación sanguínea pueden ser tan cortas como de algunos minutos.
- 45 Por lo tanto, se desarrolló la tecnología de liposomas y formulaciones "sigilosos o de sigilo", lo que permitió a los liposomas evadir la captación del RES y circular durante más tiempo (Hristova y Needham, 1993). Un agente preferido para su uso en los liposomas sigilosos es el polietilenglicol (PEG), y los liposomas resultantes también denominados liposomas PEGilados. Otros agentes sigilosos incluyen poli(2-metil-2-oxazolina) y conjugados de poli(2-etil-2-oxazolina) (Woodle *et al.*, 1994). Se describe una serie de liposomas sigilosos mejorados en la Patente de Estados Unidos nº 6.284.267, que pueden usarse en combinación con la presente invención.

- 50 Los liposomas con un diámetro menor que la fenestra de los capilares salen de la circulación por filtración. El diámetro promedio de la fenestra en tumores que se desarrollan rápidamente es mayor que en tejidos normales y por lo tanto los liposomas más pequeños de aproximadamente 100 nm de diámetro migran a los tumores. Los liposomas sigilosos se han propuesto por tanto para su uso en la administración de agentes citotóxicos a tumores en pacientes con cáncer. Se han incorporado diversos fármacos en liposomas furtivos, incluyendo cisplatino (Rosenthal *et al.*, 2002), TNF α (Kim *et al.*, 2002), doxorubicina (Symon *et al.*, 1999) y adriamicina (Singh *et al.*, 1999). Sin embargo, recientes informes han indicado inesperadamente una baja ineficacia de la doxorubicina y vinorelbina liposomal sigilosa en el tratamiento de cáncer de mama metastásico (Timassa *et al.*, 2003).

La presente invención proporciona formulaciones de liposomas sigilosos mejoradas, que superan diversos de los inconvenientes en la técnica en los que los liposomas sigilosos se asocian o recubren funcionalmente con una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la invención. No se requiere una construcción divalente en estos aspectos de la invención.

5 Cualquier liposoma furtivo puede formar la base de nuevas formulaciones liposomales y se empleará preferentemente un liposoma PEGilado. Los liposomas furtivos se "recubren", es decir, se asocian operativa o funcionalmente con una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo. La asociación operativa o funcional se efectúa de tal modo que la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo mantiene la capacidad para unirse específicamente al PS o fosfolípido aniónico diana, administrando o dirigiendo de este modo el liposoma sigiloso y cualquier contenido del mismo a células positivas a PS, tales como células tumorales y células endoteliales vasculares tumorales.

10 Los liposomas furtivos recubiertos de la invención pueden usarse en solitario. Preferentemente, sin embargo, dichos liposomas también contendrán uno o más agentes secundarios terapéuticos, tales como agentes quimioterapéuticos o contra el cáncer (siendo primer agente terapéutico el propio anticuerpo). Los segundos agentes terapéuticos se describen generalmente como situados dentro del "núcleo" del liposoma. Puede usarse uno cualquiera o más de los segundos agentes contra el cáncer o quimioterapéuticos conocidos en la técnica para conjugación, o para terapias de combinación, en los liposomas sigilosos recubiertos de anticuerpo de la invención. Por ejemplo, cualquier agente quimioterapéutico o radioterapéutico, citocina, agente antiangiogénico o agente inductor de apoptosis. Actualmente se prefieren dentro de los agentes quimioterapéuticos los fármacos antitubulina, docetaxel y paclitaxel.

15 Además, los liposomas furtivos recubiertos con anticuerpo de la invención también pueden cargarse con uno o más fármacos antivíricos para su uso en el tratamiento de enfermedades e infecciones víricas. Al igual que con los agentes anticancerosos, uno o más de los segundos agentes antivíricos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento para la conjugación con anticuerpos o para terapias de combinación, pueden usarse en los liposomas sigilosos recubiertos con anticuerpo de la invención. Como ejemplos preferidos se encuentran el actualmente cidofovir y AZT.

25 **O. Terapias antivasculares, antiangiogénica y otras**

La presente invención también puede usarse en el tratamiento de otras enfermedades en las que está implicada la vasculatura aberrante, incluyendo enfermedades y trastornos que tienen vasos sanguíneos protrombóticos. Aunque no es el único mecanismo terapéutico, la construcción, receptorcuerpo o betacuerpo de la presente invención también puede usarse para tratar a animales y pacientes con angiogénesis aberrante, tal como la que contribuye a diversas enfermedades y trastornos.

30 Ya esté basada en la anti-angiogénesis, la vasculatura protrombótica u otros mecanismos anti-vasculares, la presente invención puede por lo tanto usarse para tratar enfermedades prevalentes y/o clínicamente importantes fuera del campo del cáncer, incluyendo artritis, artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Graves, restenosis vascular, incluyendo restenosis después de angioplastia, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma y glaucoma neovascular. Otras dianas para intervención incluyen angiofibroma, placas ateroscleróticas, neovascularización de injerto de córnea, circulaciones hemofílicas, escaras hipertróficas, síndrome de Osler-Weber, fibroplasia retrolental de glaucoma biogénica, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, diversas otras enfermedades inflamatorias y trastornos e incluso endometriosis. Otras enfermedades y trastornos que son tratables por la invención y las bases unificantes de dichos trastornos se indican más adelante.

35 Una enfermedad prominente en la que está implicada la vasculatura y la angiogénesis aberrantes es la artritis reumatoide, en donde los vasos sanguíneos en el revestimiento sinovial de las articulaciones sufren angiogénesis. Además de formar nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies de oxígeno reactivas que dan lugar al crecimiento del *pannus* y a la destrucción del cartílago. Los factores implicados en la angiogénesis pueden contribuir activamente y ayudar a mantener el estado inflamado crónico de la artritis reumatoide. Los factores asociados con la angiogénesis también desempeñan un papel en la artrosis, contribuyendo a la destrucción de la articulación. Se ha demostrado que diversos factores, incluyendo VEGF, están implicados en la patogénesis de la artritis reumatoide y de la artrosis.

40 Otro ejemplo importante de una enfermedad que implica vasculatura aberrante y angiogénesis es la enfermedad neovascular ocular. Esta enfermedad está caracterizada por la invasión de nuevos vasos sanguíneos en las estructuras oculares tales como retina o córnea. Es la causa más común de ceguera y está implicada en aproximadamente veinte enfermedades oculares. En la degeneración macular relacionada con edad, los problemas visuales asociados están causados por un crecimiento interno de capilares coroidales a través de defectos en la membrana de Bruch con proliferación de tejido vascular cerca del epitelio del pigmento retiniano. La lesión angiogénica también está asociada con retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolental.

Otras enfermedades asociadas con neovascularización de la córnea que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, queratoconjuntivitis epidérmica, déficit de Vitamina A, sobreuso de lentillas,

- 5 queratitis atópica, queratitis límbica superior, pterigión, queratitis seca, Sjogrens, rosácea del acné, flectenulosis, sífilis, infecciones por micobacterias, degeneración de lípidos, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por Herpes simple, infecciones por Herpes zoster, infecciones por protozoos, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliartritis, traumatismo, sarcoidosis de Wegeners, Escleritis, enfermedad de Steven Johnson, queratotomía radial perfingoide y rechazo de injerto de córnea.
- 10 Las enfermedades asociadas con neovascularización retinal/coroidal que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, retinopatía diabética, degeneración macular, anemia calciforme, sarcoide, sífilis, seudoxantoma elástico, enfermedad de Paget, oclusión venal, oclusión arteriana, enfermedad obstructiva de la carótida, uveítis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía de prematuro, enfermedad de Eales, enfermedad de Bechets, infecciones que causan una retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, enfermedad de Best, miopía, fosas del disco óptico, enfermedad de Stargarts, *pars planitis*, desprendiendo de retina crónico, síndromes hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismo y complicaciones posteriores al láser.
- 15 Otras enfermedades que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por proliferación anómala de tejido fibrovascular o fibroso incluyendo todas las formas de vitreoretinopatía proliferativa, tanto asociada o no con la diabetes.
- 20 La inflamación crónica también implica la vasculatura aberrante y la angiogénesis patológica. Dichas patologías son colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn que muestran cambios histológicos dentro del crecimiento interno de nuevos vasos sanguíneos en los tejidos inflamados. La bartonelosis, una infección bacteriana encontrada en Sudamérica, puede dar como resultado un estado crónico que se caracteriza por una proliferación de células endoteliales vasculares.
- 25 Otra función patológica asociada con vasculatura y angiogénesis aberrante se encuentra en la aterosclerosis. Se ha demostrado que las placas formadas dentro del lumen de vasos sanguíneos tienen actividad estimuladora antiangiogénica. Hay pruebas concretas del significado patofisiológico de los marcadores angiogénicos, tales como VEGF, en la progresión de la aterosclerosis coronaria humana, así como procesos de recanalización en enfermedades coronarias obstructivas. La presente invención proporciona un tratamiento eficaz para dichas afecciones.
- 30 Una de las enfermedades angiogénicas más frecuentes de la juventud es el hemangioma. En la mayoría de los casos, los tumores son benignos y disminuyen sin intervención. En algunos casos severos, el tumor progresa a formas cavernosas e infiltrativas más grandes y crean complicaciones clínicas. Las formas sistémicas de los hemangiomas, las hemangiomas, tienen una alta tasa de mortalidad. Los hemangiomas resistentes a terapias existentes no pueden tratarse con agentes terapéuticos actualmente en uso, pero son abordados por la invención.
- 35 La angiogénesis es también responsable de la lesión encontrada en enfermedades hereditarias tales como la enfermedad de Osler-Weber-Rendu o telangiectasia hemorrágica hereditaria. Esta es una enfermedad hereditaria caracterizada por hemangiomas pequeños múltiples, tumores de vasos sanguíneos o linfáticos. Los angiomas se encuentran en la piel y en las membranas mucosas, a menudo acompañados por epistaxis (sangrados nasales) o sangrado gastrointestinal y algunas veces con fístula arteriovenosa pulmonar o hepática.
- 40 La angiogénesis está también implicada en procesos fisiológicos normales tales como la reproducción y la curación de heridas. La angiogénesis es una etapa importante en la ovulación y también en la implantación de la blástula después de la fertilización. La prevención de la angiogénesis de acuerdo con la presente invención podría usarse para inducir amenorrea, bloquear la ovulación o impedir el implante de la blástula. En la curación de heridas, la reparación excesiva o fibroplasia puede ser un efecto secundario nocivo de procedimientos quirúrgicos y puede causarse o exacerbarse por la angiogénesis. Las adherencias son una complicación frecuente de cirugía y da lugar a problemas tales como obstrucción del intestino delgado. La invención también puede tratar esto.
- 45 Cada una de las enfermedades y trastornos anteriores, junto con todos los tipos de tumores, se contemplan también para el tratamiento según la presente invención. La Patente de Estados Unidos nº 5.712.291 se identifica específicamente para demostrar adicionalmente el conocimiento de la técnica de que una vez que se ha demostrado la inhibición de la angiogénesis usando un agente concreto, puede llevarse a cabo de manera razonable el
- 50 tratamiento de una gran variedad de enfermedades asociadas con la angiogénesis aberrante. La Patente de Estados Unidos nº 6.524.583 también se identifica específicamente para fines similares y para demostrar particularmente que este principio se aplica a la inhibición de la angiogénesis y al tratamiento de enfermedades angiogénicas usando agentes terapéuticos dirigidos.
- 55 La invención también proporciona composiciones y métodos para su uso en el tratamiento de otras enfermedades en las que PS o fosfolípidos aniónicos desempeñan una función. Por ejemplo, dado que la PS está implicada en la adhesión celular, las respuestas inflamatorias y el choque séptico, puede usarse una construcción receptorcuerpo o betacuerpo en el tratamiento de la inflamación y el choque séptico.

Los fosfolípidos aniónicos, particularmente PS, también están implicados en la línea falciforme, en particular, como parte de un mecanismo de eliminación. Una construcción, receptorcuerpo o betacuerpo puede por lo tanto usarse para tratar o mejorar la anemia falciforme. Una construcción receptorcuerpo o betacuerpo de la invención también puede usarse para tratar una enfermedad parasitaria y para tratar la malaria.

5 P. Métodos de tratamiento antivíricos

La presente invención también proporciona una serie de construcciones, opcionalmente conjugadas a agentes antivíricos para su uso en el tratamiento de infecciones víricas. Los regímenes de tratamiento y particularmente las dosis, son como se describen generalmente anteriormente para el aspecto del tratamiento del cáncer de la presente invención, cuya adaptabilidad es una ventaja de toda la invención. Aunque un entendimiento del mecanismo (o mecanismos) de acción particular no es necesario para la práctica del tratamiento antivírico de la invención, algunas de las razones subyacentes al tratamiento vírico, como se confirma por los ejemplos de trabajo del presente documento son los siguientes.

Se cree que los mecanismos más importantes están relacionados con la replicación vírica y la activación de la célula hospedadora. Durante la infección vírica, el virus activa a la célula durante su replicación que se lleva a cabo en el interior de la célula. Este proceso de activación celular es necesario para la replicación vírica, como se muestra para los virus del herpes, hepatitis C y VIH-1. La progresión vírica activa la expresión génica, tanto vírica como hospedadora. Por ejemplo, la replicación del virus Pichinde y del virus Machupo se inhibe por la actinomicina D tardía en el ciclo de replicación indicando que es necesaria la transcripción génica de la célula hospedadora para completar la replicación vírica.

La activación de la célula hospedadora por el virus causa que la célula externalice fosfolípidos aniónicos tales como PS. En particular, los estudios de los inventores demuestran que la activación vírica causa flujos de Ca^{2+} en la célula, que activan la escramblasa, externalizando fosfolípidos aniónicos, particularmente PS. Las construcciones y conjugados que se unen a fosfolípidos aniónicos, preferentemente PS, después se unen e interfieren con los procesos de activación, impidiendo que el virus sea capaz de replicarse adecuadamente.

Los presentes ejemplos muestran que la invención actúa tarde en el proceso de infección vírica, bloqueando la maduración o egreso vírico. Los estudios de los inventores demuestran que el efecto inhibitorio de los agentes de la invención es ampliamente aplicable, como se demuestra funcionando en virus que usan diferentes mecanismos de agresión. Por ejemplo, los presentes ejemplos demuestran lo que el bloqueo del virus del herpes (CMV), que se escapa de las vesículas de exocitosis derivadas del Golgi y bloquean el adenovirus (virus Pichinde) y paramixovirus (RSV), que brotan directamente de la membrana plasmática.

Las células infectadas con virus externalizan fosfolípidos aniónicos, particularmente PS, que son normalmente intracelulares, es decir, están confinados a la superficie interna de la membrana plasmática. Durante el escape de los virus, los fosfolípidos se redistribuyen en el sitio del escape, acomodando el plegamiento de la membrana durante la carga vírica o exocitosis de la membrana plasmática y los fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos se externalizan durante este proceso. Las construcciones y conjugados de la invención pueden por tanto unirse a los fosfolípidos aniónicos externalizados, particularmente a PS y bloquear el escape de los virus de la célula infectada. La unión de las construcciones de la invención a células infectadas con virus también se demuestra en los presentes ejemplos.

Las construcciones y conjugados de la invención pueden unirse adicionalmente a los fosfolípidos aniónicos externalizados, particularmente PS, e interferir con o una o más vías de señalización necesarias para la expresión y/o replicación del gen vírico.

Además, los viriones con envoltura en sí mismos probablemente tienen fosfolípidos aniónicos, tales como PS, en su superficie externa. Dado que los virus carecen de una translocasa para mantener o reestablecer la asimetría de los fosfolípidos, se espera la exposición continuada de los fosfolípidos tales como PS. Las construcciones y conjugados de la invención pueden causar la opsonización, unión al complemento, fagocitosis por las células hospedadoras tales como macrófagos y eliminación de partículas sin virus.

En un aspecto adicional de la invención, los virus probablemente necesiten fosfolípidos aniónicos para la infección y/o formación de sincitios. Las construcciones y conjugados de la invención pueden adicionalmente bloquear estos aspectos del ciclo de vida de los virus uniéndose a fosfolípidos aniónicos.

De acuerdo con las anteriores características y a la luz de los presentes ejemplos, el espectro del tratamiento vírico para la presente invención se amplía a cualquier virus, con envoltura o no, de ADN o ARN. Dado que las construcciones de unión a PS y fosfolípidos aniónicos y conjugados de la invención bloquean al menos en parte la replicación vírica dentro de la célula y/o impiden el escape de virus de las células, la invención no se limita al tratamiento de virus con envoltura solamente, ni a ningún virus en particular, lo que es una ventaja importante. Por ejemplo, trabajos publicados posteriores a la investigación indica que la anexina V y las vesículas de PS pueden inhibir la infección de macrófagos por VIH-1, pero no pueden inhibir la infección de linfocitos T por VIH-1 o inhibir otros virus, tales como el virus de la estomatitis vesicular G y el virus de la leucemia murina anfitriónica (Callahan *et al.*, 2003).

De manera natural, las construcciones y conjugados de la invención actúan en virus con envoltura, particularmente aquellos virus que tienen fosfolípidos aniónicos, particularmente PS en la superficie externa de la envoltura, en la que las construcciones y conjugados causan la eliminación y/o la inhibición de la entrada de los virus en las células diana.

- 5 Un importante aspecto de la presente invención es por lo tanto que es universalmente aplicable, siendo adecuada para el tratamiento de virus recombinantes modificados por ingeniería genética, y sintéticos, por ejemplo, creados como parte de bioterrorismo. De hecho, la invención no se limita al tratamiento de animales y seres humanos. Dado que la categoría de los hospedadores encontrados en los taxones de virus incluyen algas, arqueas, bacterias, hongos, invertebrados, micoplasma, plantas, protozoos, espiroplasma y vertebrados, la invención puede usarse para
- 10 inhibir infección vírica y replicación en cualquiera de estas configuraciones, incluyendo en virus de importancia agrícola. Actualmente se prefiere el tratamiento de infección vírica y enfermedades asociadas en vertebrados y uno cualquiera o más de los virus de la **Tabla H**, que infectan a animales vertebrados, puede inhibirse y la infección resultante tratarse usando la presente invención.

TABLA H

Virus de vertebrados

15

Familia	Género	Especies Tipo
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i> <i>Aviadenovirus</i> <i>Virus Similares a la Fiebre</i> <i>Porcina Africana</i>	<i>Adenovirus humano 2</i> <i>Adenovirus Fowl 1</i> <i>Virus de la fiebre porcina africana</i>
<i>Arenaviridae</i>	<i>Arenavirus</i> <i>Arterivirus</i>	<i>Virus de la coriomengitis linfocítica</i> <i>Virus de la artritis Equina</i>
<i>Astroviridae</i>	<i>Astrovirus</i>	<i>Astrovirus humano 1</i>
<i>Bimaviridae</i>	<i>Aqabirnavirus</i> <i>Avibirnavirus</i>	<i>Virus de la necrosis pancreática infecciosa</i> <i>Virus de la enfermedad bursal infecciosa</i>
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Bunyavirus</i> <i>Hantavirus</i> <i>Nairovirus</i> <i>Phlebovirus</i>	<i>Virus de Bunyamwera</i> <i>Virus de Hantaan</i> <i>Virus de la enfermedad de la oveja de Nairobi</i> <i>Virus Siciliano de la fiebre de Sandfly</i>
<i>Caliciviridae</i>	<i>Calicivirus</i>	<i>Exantema vesicular de virus porcino</i>
<i>Circoviridae</i>	<i>Circovirus</i>	<i>Virus de la anemia de pollo</i>
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i> <i>Torovirus</i> <i>Deltavirus</i>	<i>Virus de la bronquitis infecciosa aviar</i> <i>Virus de Berne</i> <i>Delta virus de la Hepatitis</i>
<i>Filoviridae</i>	<i>Filovirus</i>	<i>Virus Marburg</i>
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i> <i>Pestivirus</i> <i>Virus similares a la Hepatitis C</i>	<i>Virus de la fiebre amarilla</i> <i>Virus de la diarrea bovina</i> <i>Virus de la hepatitis C</i>
<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Orthophepadnavirus</i> <i>Avihepadnavirus</i>	<i>Virus de la hepatitis B</i> <i>Virus de la hepatitis B de pato</i>
<i>Herpesviridae</i> Subfamilia <i>Alphaherpesvirinae</i> Subfamilia: <i>Betaherpesvirinae</i> Subfamilia <i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i> <i>Varicellovirus</i> <i>Cytomegalovirus</i> <i>Muromegalovirus</i> <i>Roseolovirus</i> <i>Lymphocryptovirus</i> <i>Rhadinovirus</i>	<i>Herpesvirus 1 humano</i> <i>Herpesvirus 3 humano</i> <i>Herpesvirus 5 humano</i> <i>Citomegalovirus de ratón 1</i> <i>Herpesvirus humano 6</i> <i>Herpesvirus humano 4</i> <i>Herpesvirus ateline 2</i>
<i>Iridoviridae</i>	<i>Ranavirus</i> <i>Lymphocystivirus</i> <i>Virus similares al virus del</i> <i>Pececillo de plata</i>	<i>Virus de rana 3</i> <i>Virus Flounder</i> <i>Virus del pececillo de plata 1</i>
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenzavirus A, B</i> <i>Influenzavirus C</i> <i>Virus similares a togoto</i>	<i>Virus de la gripe A</i> <i>Virus de la gripe C</i> <i>Togoto virus</i>
<i>Papovaviridae</i>	<i>Polyomavirus</i> <i>Papillomavirus</i>	<i>Poliomavirus murino</i> <i>Papilomavirus del conejo de Rabo de algodón</i> <i>(Shope)</i>

Familia	Género	Especies Tipo
<i>Paramyxoviridae</i> Subfamilia <i>Paramyxovirinae</i> Subfamilia <i>Pneumovirinae</i>	<i>Parayxovirus</i> <i>Morbillivirus</i> <i>Rubulavirus</i> <i>Pneumovirus</i>	<i>Virus 1 paragripal humano</i> <i>Virus de las paperas</i> <i>Virus del sarampión</i> <i>Virus sincitial respiratorio humano</i>
<i>Parvoviridae</i> Subfamilia <i>Parovirinae</i>	<i>Parvovirus</i> <i>Erythrovirus</i> <i>Dependovirus</i>	<i>Virus de Mice minute</i> <i>Virus B19</i> <i>Virus 2 adenoasociado</i>
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovims</i> <i>Rhinovirus</i> <i>Hepatovirus</i> <i>Cardiovirus</i> <i>Aphthovirus</i>	<i>Poliovirus 1</i> <i>Rinovirus humano 1A</i> <i>Virus de la hepatitis A</i> <i>Virus de la encefalomiocarditis</i> <i>Virus O de la enfermedad de pie y boca</i>
<i>Poxviridae</i> Subfamilia <i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Orthopoxvirus</i> <i>Parapoxvirus</i> <i>Avipoxvirus</i> <i>Capripoxvirus</i> <i>Leporipoxvirus</i> <i>Suipoxvints</i> <i>Molluscipoxvirus</i> <i>Yatapoxvirus</i>	<i>Virus de la vacuna</i> <i>Virus Orf</i> <i>Fowlpox virus</i> <i>Sheeppox virus</i> <i>Myxoma virus</i> <i>Swinepox virus</i> <i>Virus contagioso de molusco</i> <i>Virus del tumor de mono Yaba</i>
<i>Reoviridae</i>	<i>Orthoreovirus</i> <i>Orbivirus</i> <i>Rotavirus</i> <i>Coltivirus</i> <i>Aquareovirus</i>	<i>Reovirus 3</i> <i>Virus de la lengua azul 1</i> <i>Rotavirus de simio SA11</i> <i>Virus de la fiebre de la garrapata de colorado</i> <i>Virus de la carpa dorada</i>
<i>Retroviridae</i>	<i>Retrovirus de tipo B de mamíferos</i> <i>Retrovirus de tipo C de mamíferos</i> <i>Retrovirus de tipo C de aves</i> <i>Retrovirus de tipo D</i> <i>Retrovirus Blv-htlv</i> <i>Lentivirus</i> <i>Spumavirus</i>	<i>Virus del tumor mamario de ratón</i> <i>Virus de la leucemia murina</i> <i>Virus de la leucosis aviar</i> <i>Virus del mono Mason-Pfizer</i> <i>Virus de la leucemia bovina</i> <i>Virus 1 de la inmunodeficiencia humana</i> <i>Espumavirus humano</i>
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Vesiculovirus</i> <i>Lyssavirus</i> <i>Ephemerovirus</i>	<i>Virus Indiana de la estomatitis vesicular</i> <i>Virus de la rabia</i> <i>Fiebre efemeral bovina</i>
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i> <i>Rubivirus</i>	<i>Virus Sindbis</i> <i>Virus de la rubéola</i>

5 El uso de la invención en tratamiento de infecciones víricas y enfermedades asociadas en mamíferos se prefiere, particularmente en términos de animales valiosos o con valor, tales como caballos de carreras y animales domésticos y animales y pájaros usados para producir directamente (por ejemplo comer) o indirectamente producir (por ejemplo leche y huevos) alimento para consumo humano. Además del tratamiento en seres humanos, las realizaciones ejemplares de la invención incluyen el tratamiento de caballos, perros, gatos y similares; el tratamiento de vacas, cerdos, ganado, ovejas, cabras, búfalos, bisontes, llamas, ciervos, alces, y otros animales más grandes así como sus crías, incluyendo terneros y corderos.

10 El tratamiento de seres humanos se prefiere particularmente, ya sean virus de origen natural o aquellos creados para bioterrorismo. En términos de virus de origen natural y las enfermedades resultantes, la invención está de nuevo no limitada en sus aplicaciones. Por consiguiente cualquiera de uno o más de los virus de la **Tabla J** pueden inhibirse usando la presente invención y las infecciones y enfermedades resultantes por tanto pueden tratarse.

TABLA J

Enfermedades víricas en seres humanos

Enfermedad	Virus	Tipos de Virus
SIDA	Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)	<i>Retrovirus</i>
Bronquiolitis y neumonía víricas	Virus sincitial respiratorio	<i>Paramyxovirus</i>
Bronquiolitis	Virus paragripal	<i>Paramyxovirus</i>
Cáncer de cuello uterino	Virus del papiloma humano	<i>Papovavirus</i>
Viruela del pollo	Virus Zoster Varicela	<i>Herpesvirus</i>
Dengue	Virus del Dengue	<i>Flavivirus</i>
Fiebre hemorrágica del Ébola	Virus de Ébola	<i>Filovirus</i>
Herpes Genital	Herpes virus Simple 2	<i>Herpesvirus</i>
Fiebre hemorrágica hantavirus	Hantavirus	<i>Bunyavirus</i>
Hepatitis	Hepatitis A	<i>Picornavirus</i>
	Hepatitis B	<i>Hepadavirus</i>
	Hepatitis C	<i>Flavivirus</i>
	Hepatitis D	<i>Deltavirus</i>
	Hepatitis E	<i>Calcivirus</i>
Gripe	Virus gripal A, B y C	<i>Orthomyxovirus</i>
Fiebre Hemorrágica Argentina Junín	Virus Junin	<i>Arenavirus</i>
Fiebre hemorrágica Lassa	Virus Lassa	<i>Arenavirus</i>
Fiebre hemorrágica de Machupo	Virus Machupo	<i>Arenavirus</i>
Paperas	Virus Rubéola	<i>Paramyxovirus</i>
Mononucleosis	Virus de Epstein Barr	<i>Herpesvirus</i>
Enfermedad CMV (neumonía vírica, síndrome similar a mononucleosis)	Citomegalovirus	<i>Herpesvirus</i>
Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS)	Coronavirus humano	<i>Coronavirus</i>
Herpes	virus Varicela zoster	<i>Herpesvirus</i>
Viruela	Virus de la viruela	<i>Poxvirus</i>
Fiebre amarilla	Virus de la fiebre amarilla	<i>Flavivirus</i>
Enfermedad del Nilo Oriental	Virus del Nilo O riental	
Encefalitis equina Occidental	Virus EE Occidental	<i>Togavirus</i>
Neumonía, Hepatitis, enfermedad respiratoria aguda	Adenovirus	<i>Adenovirus</i>
Gastroenteritis	Rotavirus	<i>Rotavirus</i>
Encefalitis	Virus del Bosque de Semliki	<i>Alphavirus</i>
Viruela bovina	Virus Vaccinia	<i>Poxvirus</i>
Encefalitis	EE venezolana	<i>Alphavirus</i>
Meningitis, encefalitis, meningoencefalitis	Coriomeningitis linfocítica	<i>Arenavirus</i>
Fiebre hemorrágica de Venezuela	Virus Guanarito	<i>Arenavirus</i>
Fiebre del valle de Rift (fiebre hemorrágica, encefalitis)	Virus de la fiebre del valle de Rift	<i>Bunyavirus</i>

Enfermedad	Virus	Tipos de Virus
Fiebre Hemorrágica de Marburg	Virus Marburg	<i>Filovirus</i>
Encefalitis transmitida por garrapatas	Virus de la encefalitis transmitida por garrapata (TBEV)	<i>Flavivirus</i>
Encefalitis	Virus del Hendra	<i>Paramyxovirus</i>
Encefalitis	Virus Nipah	<i>Paramyxovirus</i>
Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo	Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo	<i>Bunyavirus</i>
Fiebre hemorrágica de Brasil	Virus Sabia	<i>Arenavirus</i>

5 La invención se contempla particularmente para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el CMV tal como neumonía vírica, síndrome similar a mononucleosis y malformaciones congénitas asociadas (sordera y retraso mental); enfermedades respiratorias, tales como las causadas por RSV, incluyendo bronquiolitis y neumonía vírica, gripe, el resfriado común y SARS; SIDA; hepatitis; cánceres asociados con infecciones víricas; mononucleosis y viruela.

10 En otras realizaciones, los inventores contemplan particularmente la inhibición de arenavirus, que son patógenos en seres humanos. Los arenavirus incluyen los virus del Viejo Mundo son responsables de la fiebre Lassa (virus Lassa) y coriomeningitis linfocítica (LCMV). La fiebre de Lassa es endémica en el África Oriental afectando a 300.000 personas anualmente y causando hasta 3000 muertes. La infección con el virus de Lassa conduce a fiebre y malaria al cabo de aproximadamente 10 días. El dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarreas son comunes. Pueden desarrollarse faringitis y resfriado. Los síntomas neurológicos son normalmente leves. Los síndromes de filtración vascular, tal como edema y derrames pleurales están presentes en la mayoría de los casos severos. El sangrado se observa aproximadamente en un cuarto de los pacientes. La enfermedad puede ocasionar cambios en el sistema cardiovascular que culminan en choque y muerte.

15 Los arenavirus también se incluyen y los virus del Nuevo Mundo antigénicamente distintos responsables de la fiebre hemorrágica de Argentina (Junin virus), fiebre hemorrágica Boliviana (Machupo virus) y fiebre hemorrágica de Venezuela (Guanarito virus). Todos estos virus están en la Categoría CDC A de la lista de posibles armas bioterroristas.

20 Las dosis que son adecuadas para las realizaciones antitumorales también son adecuadas para los tratamientos antivíricos. De manera similar, la administración múltiple puede usarse para infecciones crónicas, y altas dosis pueden usarse para infecciones agudas. Cualquier vía de administración adecuada puede emplearse, de nuevo como se desvela para los aspectos y el tratamiento del cáncer, incluyendo IV, IM, SC, como un aerosol a los pulmones o a las vías respiratorias y similares.

25 Los agentes terapéuticos proporcionados por la invención son agentes valiosos que tiene un amplio espectro de actividad antivírica. Además de ser eficaces contra una gran cantidad de virus posiblemente letales, los agentes también pueden administrarse después de la exposición a los virus, incluso en entornos en los que la naturaleza exacta del virus no se conoce. Por tanto, los agentes terapéuticos antivíricos de la presente invención no requieren un periodo de tiempo prolongado entre la identificación del patógeno y la administración de la terapia, en notable contraste con el tiempo y el gasto que conlleva el desarrollo, producción o administración de vacunas específicas.

30 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Debe apreciarse por los expertos en la técnica que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen a continuación representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención y por tanto pueden considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deben apreciar, a la luz de la presente descripción, que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y aún obtener un resultado similar o idéntico sin salirse del espíritu y alcance de la invención.

Ejemplo I

Tratamiento tumoral con coagulando anti-VCAM-1-tTF

40 El presente ejemplo muestra la coagulación específica de la vasculatura tumoral *in vivo* que resulta después de la administración de un coagulando dirigido a la vasculatura tumoral ("coagulando") a animales portadores de tumor y los efectos antitumorales resultantes. En este coagulando, un anticuerpo dirigido contra VCAM-1 (molécula 1 de adhesión endotelial vascular VCAM-1) se usa como un agente de direccionamiento para administrar el factor tisular truncado (tTF), una forma modificada de un coagulante humano, a la vasculatura tumoral.

45 El hibridoma MK2.7, que secreta un anticuerpo IgG₁ de rata contra VCAM-1 murino se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD; ATCC CRL 1909). El hibridoma R187, que secreta un anticuerpo

IgG₁ de rata contra la proteína vírica murina p30 gag, también se obtuvo de la ATCC y se usó como un control del mismo isotipo para el anticuerpo anti-VCAM-1.

5 Los vasos sanguíneos de los órganos principales y tumores de ratones portadores de tumores de Hodgkin humano L540 subcutáneos se examinaron con inmunohistoquímica para determinar la expresión de VCAM-1 usando un anticuerpo anti-VCAM-1. En general, la expresión de VCAM-1 se observó en 20-30 % de vasos sanguíneos tumorales totales teñidos por el anticuerpo antiendoglina MJ 7/18, usado como un control positivo. Se observó expresión vascular constitutiva de VCAM-1 en corazón y pulmones en animales tanto normales como portadores de tumores. Se observó tinción estromal fuerte en testículos en donde la expresión de VCAM-1 era estrictamente extravascular.

10 Se inyectó a ratones portadores de tumores L540 subcutáneos por vía intravenosa con anticuerpo anti-VCAM-1 y dos horas después se exanginó a los ratones. Se extirparon el tumor y los órganos normales y se prepararon y analizaron con inmunohistoquímica secciones congeladas para determinar la localización del anticuerpo. El anticuerpo anti-VCAM-1 se detectó en endotelio de tumor, corazón y pulmón. La tinción fue específica y no se observó tinción de endotelio en el tumor y órganos de ratones inyectados con una especie de anticuerpo del mismo isotipo de especificidad irrelevante, R187. No se observó localización de anticuerpo anti-VCAM-1 en testículos o en cualquier órgano normal excepto en corazón y pulmones.

Se preparó un conjugado anti-VCAM-1•tTF o “coaguligando” usando el factor tisular truncado (tTF). La administración intravenosa del coaguligando anti-VCAM-1•tTF induce trombosis selectiva de vasos sanguíneos tumorales, en oposición a vasos en tejidos normales, en ratones portadores de tumores.

20 El coaguligando anti-VCAM-1•tTF se administró a ratones portadores de tumores L540 subcutáneos de un diámetro de 0,4 a 0,6 cm. Antes de la inyección del coaguligando, los tumores estaban sanos, tenían una morfología uniforme carentes de regiones de necrosis. Los tumores estaban bien vascularizados y tenían una ausencia completa de vasos trombóticos espontáneamente o de hemorragias. Al cabo de cuatro horas después de la inyección con el coaguligando, el 40-70 % de los vasos sanguíneos se trombosaron, a pesar de la tinción inicial de únicamente 20-30 % de los vasos sanguíneos tumorales. Los vasos trombosados contenían agregados plaquetarios oclusivos, eritrocitos empaquetados y fibrina. En varias zonas, los vasos sanguíneos se habían roto, vertiendo eritrocitos al intersticio tumoral.

24 horas después de la inyección del coaguligando, los vasos sanguíneos aún estaban ocluidos y había hemorragia extensiva que se había dispersado a lo largo del tumor. Las células tumorales se habían separado entre sí, tenían un núcleo pignótico y se sometieron a citólisis. A las 72 horas, la necrosis avanzada fue obvia en todo el tumor. Es posible que la deposición de trombina inducida por el coaguligando inicial da como resultado inducción aumentada del antígeno diana VCAM-1 en vasos centrales amplificando de este modo el direccionamiento y la destrucción tumoral.

30 La acción trombótica de anti-VCAM-1•tTF en vasos tumorales fue específica de antígeno. Ninguno de los reactivos de control administrado a cantidades equivalentes (tTF solo, anticuerpo anti-VCAM-1 solo, tTF más anticuerpo anti-VCAM-1 o el coaguligando control de especificidad irrelevante) causaron trombosis.

Además de la trombosis de los vasos sanguíneos tumorales, este estudio también muestra que la administración intravenosa del coaguligando anti-VCAM-1•tTF no induce la trombosis de vasos sanguíneos en órganos normales. A pesar de la expresión de anti-VCAM-1 en vasos en el corazón y en pulmón de ratones normales o portadores de tumor L540, la trombosis no se produjo después de la administración del coaguligando anti-VCAM-1•tTF. No se observaron signos de trombosis, lesión tisular o morfología alterada, en 25 ratones inyectados con 5 a 45 µg de coaguligando 4 o 24 horas anteriores. Hubo un aspecto histológico normal del corazón y pulmones del mismo ratón que tuvo trombosis tumoral principal. Los otros órganos principales (cerebro, hígado, riñón, bazo, páncreas, intestino, testículos) tampoco vieron alterada su morfología.

40 Las secciones congeladas de órganos y tumores de los ratones tratados con coaguligando dieron patrones de tinción coincidentes cuando se revelaron con cualquiera de anticuerpo anti-TF, 10H10 o un anticuerpo anti-IgG de rata y confirmaron que el coaguligando se había localizado en vasos en el corazón, pulmón y tumores. La intensidad de la tinción era igual a la observada cuando el coaguligando se aplicaba directamente a las secciones de altas concentraciones, seguido de revelado con anti-TF o anti-IgG de rata, indicando que la saturación de la unión se había unido *in vivo*.

Estos estudios muestran que la unión del coaguligando a VCAM-1 en la vasculatura normal en corazón y pulmón no es suficiente para inducir la trombosis y que la vasculatura tumoral proporciona factores adicionales para soportar la coagulación.

55 La actividad anti tumoral del coaguligando anti-VCAM-1•tTF se determinó en ratones SCID portadores de tumores L540 de 0,3-0,4 cm³. El fármaco se administró i.v. 3 veces a intervalos de 4 días. El volumen medio tumoral de los ratones tratados con anti-VCAM-1•tTF se redujo significativamente a los 21 días del tratamiento ($P < 0,001$) en comparación con los otros grupos. Nueve de un total de 15 ratones tratados con el coaguligando específico mostraron una reducción mayor de 50 % en el volumen tumoral. Este efecto fue específico ya que el tTF no

conjugado, el coagulando IgG control y la mezcla de anticuerpo anti-VCAM-1 libre no afectaron al crecimiento tumoral.

Ejemplo II

Expresión de fosfatidilserina en vasos sanguíneos tumorales

5 Para explicar la ausencia de efecto trombótico de anti-VCAM-1+tTF en vasculatura positiva a VCAM-1 en corazón y pulmones, algunos de los inventores desarrollaron un concepto de localización diferencial de aminofosfolípido y fosfolípidos aniónico, por ejemplo PS y PE, entre vasos sanguíneos tumorales y normales. Específicamente, plantearon la hipótesis de que las células endoteliales en tejidos normales segregaban aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, por ejemplo PS y PE, en la superficie interna de la bicapa fosfolipídica de la membrana plasmática, donde PS no podía participar en reacciones trombóticas; mientras que las células tumorales en tumores translocan aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos a la superficie externa de la membrana plasmática, donde PS puede soportar la acción de coagulación del coagulando. La expresión de PS en la superficie celular permite la coagulación porque permite la unión de los factores de coagulación a la membrana y coordina el ensamblaje de los complejos de inicio de la coagulación.

15 El modelo de los inventores de la translocación aminofosfolipídica y fosfolípidos aniónicos en la superficie de células endoteliales de vasos sanguíneos tumorales, como se desarrolla en el presente documento es sorprendente ya que la expresión de PS no se produce después, y no desencadena inevitablemente, la muerte celular. La expresión de aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos en la superficie de células endoteliales tumorales es por tanto suficientemente estable para permitir que los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, por ejemplo PS y PE, sirvan como entidades direccionables para intervención terapéutica.

20 Para confirmar la hipótesis de que el endotelio de los vasos sanguíneos tumorales expresa PS sobre la superficie luminal de la membrana plasmática, los inventores usaron el siguiente estudio inmunohistoquímico para determinar la distribución del anticuerpo anti-PS después de inyección intravenosa en ratones portadores de tumor L540.

A. Métodos

25 Anticuerpos anti-PS y anti-cardiolipina, ambos anticuerpos IgM monoclonales de ratón, se produjeron y caracterizaron por Rote *et al.*, (1993) como se describe en el Ejemplo IV. La principal reactividad de 3SB es con PS, pero esta también tiene reactividad con el fosfolípido aniónico, ácido fosfatídico, un componente relativamente minoritario de la membrana plasmática, también segregado estrechamente en la cara interna en células normales.

30 Se inyectó a ratones portadores de tumor L540 por vía i.v. con 20 µg de cualquiera de los anticuerpos IgM anti-PS o anticardiolipina de ratón. Después de 10 minutos, los ratones se anestesiaron y sus circulaciones sanguíneas se perfundieron con suero salino heparinizado. Los tumores y los tejidos normales se extirparon y se ultracongelaron. Secciones en serie de órganos y tumores se tiñeron con cualquiera de anti-IgM de ratón marcado con HRP para la detección del anticuerpo anti-PS o con anticuerpo anti-VCAM-1 seguido por anti-Ig de rata marcado con HRP.

35 Para preservar los fosfolípidos de la membrana en las secciones congeladas, se desarrolló el siguiente protocolo. Los animales se perfundieron con DPBS que contenía Ca^{2+} 2,5 mM. Los tejidos se montaron en portaobjetos cubiertos con 3-aminopropiltriethoxisilano y se tiñeron al cabo de 24 horas. No se usaron disolventes orgánicos, formaldehído ni detergente para la fijación o el lavado de los portaobjetos. Los portaobjetos se rehidrataron mediante DPBS que contenía Ca^{2+} 2,5 mM y gelatina al 0,2 %. También se usó la misma solución para lavar las secciones para retirar el exceso de reactivos. Las secciones se incubaron con anti-IgM de ratón marcado con HRP durante 3,5 h a temperatura ambiente para detectar anti-IgM PS.

B. Resultados

45 Este estudio inmunohistoquímico mostró que el anticuerpo anti-PS localizado al cabo de 10 minutos en la mayoría de los vasos sanguíneos tumorales, incluyendo vasos en la región central del tumor que carecían de VCAM-1. Los vasos que eran positivos para VCAM-1 eran también positivos para PS. Por tanto, hay una expresión coincidente de PS sobre vasos que expresan VCAM-1 en tumores.

50 En los estudios de localización *in vivo*, ninguno de los vasos en órganos normales, incluyendo vasculatura VCAM-1 positiva de corazón y pulmón, se tiñeron, indicando que PS estaba ausente de la superficie externa de las células endoteliales. Por otro lado, cuando las secciones de los tejidos normales y tumores se tiñeron directamente con anticuerpo anti-PS *in vitro*, no hubo diferencias visibles entre tipos de células normales y tumorales endoteliales y otros tipos, mostrando que PS estaba presente dentro de estas células pero únicamente comienza a expresarse sobre la superficie de células endoteliales en tumores.

55 La especificidad de la detección de PS se confirmó mediante dos estudios independientes. Primero, un anticuerpo monoclonal IgM de ratón dirigido contra un lípido cargado negativamente diferente, cardiolipina, no se dirigió contra el tumor o ningún órgano *in vivo*. En segundo lugar, el tratamiento previo de secciones congeladas con acetona anuló la tinción con anticuerpo anti PS, presumiblemente porque este extrae los lípidos junto con el anticuerpo anti-

PS unido.

Ejemplo III

La anexina V bloquea la actividad de coagulando

5 El presente ejemplo proporciona una evidencia adicional de la función de la expresión de PS en la superficie en la actividad coagulando de estudios usando el ligando de unión a PS de alta afinidad, la anexina V, que bloquea la función de PS *in vitro* e *in vivo*.

A. La anexina V bloquea la activación de coagulando del factor X *in vitro*

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

15 La necesidad de la expresión PS en la superficie en la acción del coagulando se indica adicionalmente mediante el hallazgo de los inventores de que la anexina V, que se une a PS con alta afinidad, bloquea la afinidad del anti-VCAM-1•tTF unido a las células bEnd.3 para generar el factor Xa *in vitro*.

20 La anexina V añadida a células permeabilizadas preincubadas con anti-VCAM-1•tTF inhibió la formación de factor Xa de una manera dependiente de la dosis. En ausencia de Anexina V, el coagulando unido a las células produjo 95 ng de factor Xa por 10.000 células por 60 minutos. La adición de cantidades crecientes de Anexina V (en el intervalo de μ g por ml) inhibió la producción del factor Xa. A 10 μ g o ml, la Anexina V inhibió la producción del factor Xa un 58 %. No se observó inhibición adicional aumentando la concentración de Anexina V durante el ensayo, lo que indicaba que la anexina V saturaba todos los sitios de unión disponibles a 10 μ g por ml.

B. La anexina bloquea la actividad de coagulando *in vivo*

25 La capacidad de la Anexina V para inhibir la trombosis inducida por coagulando *in vivo* se examinó en ratones SCID portadores de Hodgkin L540. Los tumores se desarrollaron en ratones y se inyectó a dos ratones por grupo (tamaño de tumor 0,5 cm de diámetro) por vía intravenosa a través de la vena caudal con uno de los siguientes reactivos: a) solución salina; b) 100 μ g de Anexina V; c) 40 μ g de anti-VCAM-1•tTF; d) 100 μ g de Anexina V seguido de 2 horas después mediante 40 μ g de anti-VCAM-1•tTF.

30 Cuatro horas después de la última inyección se anestesió y perfundió a los ratones con solución salina heparinizada. Los tumores se extirparon, se fijaron con formalina al 4 %, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina eosina. Se contó el número de vasos sanguíneos trombosados y no trombosados y se calculó el porcentaje de trombosis.

35 La Anexina V también bloquea la actividad del coagulando anti-VCAM-1•tTF *in vivo*. Los grupos de ratones portadores de tumores se trataron con uno de los siguientes reactivos de control o ensayo. Los ratones recibieron (a) solución salina; (b) 100 μ g de Anexina V; (c) 40 μ g de coagulando anti-VCAM-1•tTF; o (d) 100 μ g de Anexina V seguido de 2 horas después por 40 μ g de coagulando anti-VCAM-1•tTF. Se obtuvieron idénticos resultados en los dos ratones por grupo.

No se observaron trombosis espontánea, hemorragias o necrosis en los tumores procedentes de ratones inyectados con solución salina. El tratamiento solo con Anexina V no alteró la morfología del tumor.

40 De acuerdo con otros datos presentados en el presente documento, 40 μ g de coagulando anti-VCAM-1•tTF causó trombosis en el 70 % de los vasos sanguíneos tumorales totales. La mayoría de los vasos sanguíneos se ocluyeron con eritrocitos y coágulos empaquetados y las células tumorales se separaron entre sí. Ambos efectos antitumorales inducidos por coagulando, es decir, trombosis intravascular y cambios en la morfología celular tumoral, se anularon por completo tratando previamente los ratones con Anexina V.

45 Estos hallazgos confirman que los efectos antitumorales de los coagulandos están mediados a través del bloqueo de la vasculatura tumoral. Estos datos también demuestran que PS es esencial para trombosis inducida por coagulando *in vivo*.

Ejemplo IV

Generación de anticuerpos contra aminofosfolípidos, fosfolípidos aniónicos y complejos

50 Este ejemplo describe un protocolo de inmunización diseñado por los inventores a la luz de sus observaciones sobre la traslocación de aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos en células endoteliales vasculares tumorales, y descubrir que funcionan bien en la generación de anticuerpos contra aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos. Se

obtuvieron diversos anticuerpos reactivos con aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, tales como PS y PE. En los presentes ejemplos y siguientes, para simplificar, los anticuerpos reactivos con PS se denominaron “anticuerpos anti PS”, aunque la unión de algunos de estos anticuerpos no está limitada a PS pero se extiende para algunos otros aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos como se muestra en el presente documento.

5 A. Protocolo de inmunización

Para presentar los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos al sistema inmunitario como fuertes inmunógenos, los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos se formularon como células positivas a aminofosfolípidos y positivas a fosfolípidos aniónicos. Los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos insertados en la membrana, rodeados por otros componentes de la membrana, tenían una mejor conformación y tasa de eliminación para suscitar anticuerpos.

10 El intento era inmunizar animales inmunocompetentes con células autólogas que expresan aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, como se ilustra en este caso mediante PS, en el que los animales no pueden producir anticuerpos contra todos los antígenos de la propia superficie, pero reconocerían los fosfolípidos expuestos en la membrana, por ejemplo PS, como un elemento ajeno. El procedimiento es aplicable al uso de cualquier animal de laboratorio estándar, tales como ratones BALB/c inmunocompetentes y ratas Lewis, con cualquier célula positiva a
15 aminofosfolípidos y positiva a fosfolípidos aniónicos.

Los ratones BALB/c y células de endotelioma de ratón, bEnd.3 (células endoteliales de ratón inmortalizadas (cepa BALB/c)) se seleccionaron en primer lugar. Se cultivaron bEnd.3 en DMEM al 10 % con tampón HEPES 9 ml/500 ml en un incubador con CO₂ al 10 %. Las células bEnd.3 se expandieron en matraces T175 TC hasta obtener el número de células deseado. Típicamente, cada matraz a ~70-80 % de confluencia tenía aproximadamente 3 x 10⁶
20 células y cada ratón debe recibir de 1 x 10⁶ a 20 x 10⁶ células, hasta 1 x 10⁷ células.

Las células bEnd.3 se trataron con 50 µM a 200 µM de peróxido de hidrógeno durante 1 o 2 horas a 37 °C para exponer los fosfolípidos aniónicos, tales como PS, antes de la inmunización. La solución madre de H₂O₂ es [9,8 M]; 30 % (v/v). Esto se diluyó a 1:1000, después se añadieron 0,4 ml en los matraces T175 TC con 40 ml de medio a una concentración final de H₂O₂ de 100 µM. Las células se mantuvieron durante 1 hora a 37 °C. Para la recogida, las
25 células se lavaron 3X con PBS caliente, + EDTA 10 mM, para retirar todo la BSA o la proteína sérica en el medio. Las células se retiraron con tratamiento suave con tripsina, se lavaron y centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en DMEM sin aditivos al volumen apropiado (cada ratón recibió aproximadamente 1 x 10⁷ células en 200 µl) y se mantuvieron en hielo.

Las células tratadas de esta manera se inyectaron IP (200 µl de suspensión celular) en cada ratón usando una jeringa de 1 ml y una aguja de calibre 23. Los ratones se inmunizaron de tres a siete veces a intervalos de 3 a 4
30 semanas. Los sueros inmunitarios se recogieron exsanguinando a los ratones diez días después de cada refuerzo, comenzando desde el segundo refuerzo. La titulación del suero para anti-PS se ensayó por ELISA.

Estas inmunizaciones con células positivas a PS autólogas no dieron como resultado una producción no restringida de autoanticuerpos, pero fue limitada para la producción de anticuerpos reactivos con PS, reactivos con PS en combinación con otros aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos y/o reactivos con PS en combinación con proteínas
35 en suero.

En otro estudio, se inmunizó a ratas Lewis hembra con células endoteliales bEnd.3 que se habían tratado con 200 µM de peróxido de hidrógeno durante 2 horas. El tratamiento causó la translocación de fosfolípidos aniónicos en la superficie externa en el 70-90 % de las células detectadas por anexina V marcada con ¹²⁵I. Las células tratadas se
40 lavaron, se desprendieron y se contaron. Dos millones de células se suspendieron en PBS estéril y se inyectaron 5 veces i.p., con un intervalo de 3 semanas entre inyecciones. El título de anticuerpos policlonales contra fosfolípidos aniónicos se determinó 2 días después de cada inmunización.

B. Antisueros de alta titulación

Se obtuvieron ratones con títulos extremadamente altos de anticuerpos reactivos con fosfolípidos aniónicos tales como PS (Tabla 1). Los ratones no mostraron ningún signo de toxicidad. Aunque este protocolo de inmunización era
45 más efectivo en ratones que en ratas en su conjunto, la inmunización de las ratas fue efectiva y produjo el anticuerpo 9D2 (véase más abajo).

TABLA 1

Generación del anticuerpo IgG anti-PS

Intervalo de Titulación	Número de Ratones por Grupo (% de total)
1:100-1:1.000	2/30 (6,66 %)

1:1000-1:10.000	5/30	(16,6 %)
1:10.000-1:100.000	18/30	(60 %)
1:100.000-1.000.000	5/30	(16,6 %)

En adicionales inmunizaciones, diversos ratones se inmunizaron tres veces con células bEnd.3 tratadas con peróxido de hidrógeno y el suero se ensayó 54 días después de la primera inmunización. Los anticuerpos IgG reactivos con PS dentro del suero se detectaron con un IgG antiratón, el anticuerpo secundario específico de Fc y los anticuerpos IgM dentro del suero se detectaron con un anticuerpo secundario específico de IgG mu antiratón. Se obtuvieron diversos antisueros efectivos con IgG e IgM reactivos con PS usando este protocolo de inmunización, del cual los antisueros con anticuerpos IgG eran generalmente más efectivos.

Estos métodos pueden ahora usarse para generar partículas adicionales de anticuerpos anti PS, por ejemplo, incluyendo los explorados para la competición de manera eficaz con el anticuerpo 3G4 descrito más adelante. Típicamente, cuando la titulación de IgG de los anticuerpos deseados para PS alcanza >200.000, pero la titulación de PC es <50.000, la fusión puede realizarse para generar el anticuerpo monoclonal.

Además, estos métodos no se limitan a un tratamiento de células inicial con H₂O₂, ya que pueden usarse otros métodos para inducir la expresión de aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos. Por ejemplo, el tratamiento con TNF y actinomicina D es otro método útil. En un caso, las células bEnd.3. subconfluentes (~85% de confluencia) se trataron con TNF de ratón a 10 ng/ml y actinomicina a 1 µg/ml durante 16 horas a 37 °C en la incubadora. Después las células se cogieron a través del procedimiento de inmunización como se ha indicado anteriormente. El tratamiento con el agente alterador de membrana, lisofosfatidilcolina (LPC) también se usó para inducir la exposición de PS.

C. Anticuerpos monoclonales IgG e IgM

Se obtuvieron hibridomas por fusión de esplenocitos de animales inmunizados con células de mieloma P3X63AG8.653 acompañantes (ATCC, Rockville, MD).

Un aspecto importante de la técnica de los inventores para preparar anticuerpos monoclonales útiles en el tratamiento de tumor es la estrategia de selección, que implica explorar anticuerpos seleccionados que se unen a aminofosfolípidos o fosfolípidos aniónicos, pero no a fosfolípidos neutros. Otro aspecto importante es seleccionar anticuerpos que no causen o contribuyan significativamente al síndrome antifosfolípido.

Esta estrategia es aislar anticuerpos monoclonales reactivos con PS, por ejemplo, implicados en la exploración de sobrenadantes de hibridoma en placas recubiertas de PS usando una IgG anti ratón, anticuerpo secundario específico de Fc gamma. La exploración se realizó primero contra cuatro fosfolípidos (PS, fosfatidilserina; PE, fosfatidiletanolamina; CL, cardiopina y PC fosfatidilcolina) así como en células bEnd.3. Los clones reactivos con el fosfolípido neutro PC se desecharon así como los clones no reactivos con las células bEnd.3. Se seleccionaron clones anti PS de alta unión. Los pocillos que tenían solo reactividad con PS, o fuerte preferencia por PS se subclonaron en primer lugar y los pocillos que presentaron reactividad con PS en combinación con la unión a otros fosfolípidos aniónicos se subclonaron en segundo lugar.

En algunos de los estudios siguientes, también se incluyeron los anticuerpos IgM monoclonales de ratón denominados 3SB, D11 y BA3 producidos como se describe por Rote *et al.* (1993). El anticuerpo 3SB se describió en la bibliografía como un anticuerpo anti-PS y el anticuerpo D11 se describió en la bibliografía como un anticuerpo anti-cardiolipina (anti-CL). En Rote *et al.* (1993) se describen detalles de la generación y caracterización de estos anticuerpos.

Se determinó el isotipo de cada hibridoma seleccionado generado por los inventores. Como los anticuerpos de clase IgG tenían numerosas ventajas sobre IgM, incluyendo típicamente mayor afinidad, menor tasa de eliminación *in vivo* y simplicidad de purificación, modificación y manipulación, su generación fue particularmente deseada. Para centrarse en pocillos con isotipo IgG homogéneo, los pocillos que contenían IgM o una mezcla de diferentes Ig se desecharon o reclonaron. La subclonación de clones altamente positivos se repitió de tres a cuatro veces.

El isotipo de los anticuerpos IgG e IgM representativos, determinado por ELISA, se muestra en la Tabla 2. Los inventores inicialmente denominaron al anticuerpo 3G4 "F3-G4", antes de cambiar la designación a 3G4. Esto no refleja ningún cambio en el material biológico. La dependencia del suero o independencia de los anticuerpos también se expone en la Tabla 2 (véase también el ejemplo XXX).

TABLA 2

Isotipo y dependencia de suero de los anticuerpos anti-PS

Nombre	Origen	Especie/Isotipo	¿Cofactor en suero?
3SB	Rote <i>et al</i> , 1993	IgM Kappa de Ratón	No
D11	N. Rote	IgM Kappa de Ratón	
BA3	Rote <i>et al</i> , 1993	IgM Kappa de Ratón	
3G4	Este estudio	IgG ₃ Kappa de Ratón	Sí, β2-glucoproteína I
2aG4	Este estudio	IgG _{2a} de ratón	Si
Ch3G4	Este estudio	IgG ₁ quimérica humana	Sí
9D2	Este estudio	IgM Kappa de Rata	No
P2D9	Este estudio	IgG ₃ de ratón	
1B12	Este estudio	IgG ₁ Kappa de ratón	
1B9	Este estudio	IgG ₁ Kappa de ratón	Sí
3B10	Este estudio	IgG ₃ Kappa de ratón	Sí, al menos β2-glucoproteína I
2G7	Este estudio	IgG ₁ Kappa de ratón	Sí
7C5	Este estudio	IgG ₁ Kappa de ratón	Sí
3F8	Este estudio	IgG ₃ de ratón	
Anexina V			No

D. Protocolo ELISA y caracterización inicial de anticuerpo

- 5 Adicionalmente los anticuerpos se estudiaron mediante ELISA y se compararon con 3SB y D11. El ELISA anti PS usado en ejemplos de los presentes estudios se realizó de la siguiente manera. Salvo que se especifiquen diferencias particulares, este es el formato de ELISA usado en todos los estudios de la presente solicitud. Posteriormente se desarrollaron otros tipos de ELISA y los resultados de estos estudios se exponen en el Ejemplo XXX.
- 10 El ELISA del presente ejemplo se ilustra usando el antígeno PS (P-6641 25 mg 10 mg/ml (el disolvente es cloroformo:MeOH 95:5) en un frasco de 2,5 ml). Usando el mismo protocolo pueden usarse otros fosfolípidos. La solución madre de PS (u otros fosfolípidos deben dividirse en alícuotas y conservarse en un envase herméticamente cerrado a -30 °C. Las placas de 96 pocillos preferidos son Immulon 1 de fondo en forma de U de Dynatech (de Laboratorios Dynatech, n° de Catálogo 011-010-3550).
- 15 El tampón de bloqueo convencional usado en el presente ejemplo es suero bovino al 10 % disuelto en PBS. Son idóneas otras soluciones de bloqueo, pero cualquier detergente debe excluirse de las soluciones de bloqueo y lavado. El anticuerpo primario es la muestra de ensayo o mezcla. El anticuerpo secundario preferido es IgG de cabra anti-ratón conjugada a HRP. Las soluciones de revelado fueron: 10 ml de Na₂PO₄ 0,2 M, 10 ml de ácido cítrico 0,1 M, un comprimido de OPD de 10 mg y 10 µl de peróxido de hidrógeno. La solución de terminación es H₂SO₄ 0,18 M.
- 20 El protocolo del presente ejemplo conlleva el recubrimiento de una placa de 96 pocillos con PS de la siguiente manera: se diluye la solución madre de PBS en n-hexano a 10 µg/ml y se mezcla bien. Se añaden 50 µl a cada pocillo y se deja evaporar durante una hora. Se añaden 200 µl de suero al 10 % (u otro tampón de bloqueo) a cada pocillo, se cubre y se mantiene a temperatura ambiente durante 2 horas o durante una noche a 4 °C. Se lava la placa tres veces con PBS. Se añade un anticuerpo primario (diluído en tampón de bloqueo) y se incuba durante 2
- 25 horas a 37 °C. Se lava tres veces con PBS. Se añaden 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario (típicamente IgG de cabra anti-ratón conjugada a HRP u otro anticuerpo secundario apropiado) y se incuba durante 1 hora a 37 °C. Se lava la placa tres veces con PBS. Se revela el ELISA añadiendo 100 µl de solución de revelado a cada uno de los pocillos, se revela durante 10 minutos y después se añaden 100 µl de solución de determinación a cada placa y se lee la D.O. a 490 nm.
- 30 Los siguientes resultados se presentan para 9D2, 1B12, 3G4 y 1B9. La afinidad de estos anticuerpos por PS se determinó y se comparó con la de 3SB. Algunas de las afinidades relativas de los nuevos anticuerpos están mucho más mejoradas en comparación con la 3SB (Tabla 3).

TABLA 3
Afinidad relativa de anticuerpos anti-PS

Nombre	CE ₅₀ (µg/ml) ¹	Unión frente a 3SB (aumento en veces)	CE ₅₀ (nM) ²	Afinidad frente a 3SB (aumento en veces)
3SB	0,468	1	0,518	1
D11	>40,0	0,011	>44,4	0,011
9D2	0,104	4,50	0,115	4,50
1B12	0,312	1,50	2,07	0,25
3G4	0,040	11,7	0,266	1,94
1B9	0,019	24,6	0,126	4,11
Anexina V ³	0,100	4,68	2,77	0,18

¹Basado en diluciones de sobrenadantes de Cultivo Tisular; concentración de IgG e IgM se determinaron mediante ELISA de tipo sándwich usando cualquiera de los Ig de antirato o rata como anticuerpos de captura. Todos los clones se segregan en un promedio de 10 a 15 µg/ml de Ig.

²PM usado para la conversión: IgM - 900 kDa, IgG - 150 kDa, Anexina V - 36 kDa

³Afinidad de Anexina V con respecto a PS está en el intervalo de 0,1 nM a 1 nM. El valor en esta tabla representa la unión de Anexina V biotinilada comercial detectada por estreptavidina-HRP usando las mismas condiciones ELISA que las de los anticuerpos anti PS.

La especificidad de los anticuerpos se determinó mediante ELISA usando placas revestidas con los siguientes fosfolípidos: PS, fosfatidilserina; PE, fosfatidiletanolamina; PI, fosfatidilinositol; PA, ácido fosfatídico; PG, fosfatidilglicerol; PC, fosfatidilcolina; CL, cardiolipina; y SM, esfingomielina. Los perfiles de especificidad de 9D2, 1B12, 3G4 y 1B9, en comparación con 3SB y D11, se muestran en la Tabla 4.

5

TABLA 4
Especificidad de los fosfolípidos de anticuerpos anti PS

Nombre	Fuerza Relativa de Reactividad Sobre ELISA ^{1,2}
3SB	PS=PA>>CL, PI, PE, PG
D11	CL=PA>>PS, PI, PE, PG
3G4	PS=PA=PI=PG=CL>>PE
2aG4	PS=PA=PI=PG=CL>>PE
Ch3G4	PS=PA=PI=PG=CL>>PE
9D2	PA>PS=CL>PG=PI>>PE
P2D9	PS > PE = CL (No PC)
1B12	PS=PA>CL>PE=PI, PG
3B10	PS=PA=PI>>PE
1B9	Solo PS
2G7	Solo PS
7C5	Solo PS
3F8	PS > PE > CL (poco o sin PC)
Anexina V	PS=PE=PI=PA>CL>PG

¹El símbolo > indica al menos una diferencia de 2 veces en la unión a diversos fosfolípidos ensayados a una concentración idéntica de anticuerpo.

²El símbolo >> indica al menos una diferencia de 10 veces en la unión con diversos fosfolípidos ensayados a una concentración idéntica de anticuerpos.

Los anticuerpos 1B9, 2G7 y 7C5 se comportan esencialmente igual. Estos anticuerpos reconocen solo PS y requieren suero o proteínas séricas para la unión a PS. La unión de 1B9, 2G7 y 7C5 a diversos fosfolípidos en el presente ejemplo se ensayó solamente en presencia de suero bovino al 10 %, mientras que la unión de otros anticuerpos se ensayó bien en ausencia o en presencia de suero. 3SB está esencialmente desprovisto de reactividad con fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, así como con fosfatidilcolina y esfingomiolina (Tabla 4).

E. Caracterización adicional de anticuerpos

Se ensayó adicionalmente la reactividad del anticuerpo 3G4 con fosfolípidos inmovilizados en plástico. Los fosfolípidos se disolvieron en n-hexano a una concentración de 50 µg/ml. A los pocillos se añadieron 100 µl de esta solución de placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de la evaporación de disolvente en aire, las placas se bloquearon durante 2 h con FBS al 10 % diluido en DPBS que contenía Ca^{2+} 2 mM (tampón de ensayo). El anticuerpo 3G4 se diluyó en el tampón de ensayo en presencia de suero bovino al 10 % a una concentración inicial de 33 nM. Se prepararon diluciones en serie de factor dos en las placas (100 µl por pocillo). Después, las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar, se usó IgG de cabra anti-ratón conjugada a HRP (diluida a 1:1000) para detectar 3G4. Los reactivos secundarios se detectaron usando sustrato cromogénico OPD seguido por la lectura de las placas a 490 nm usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Palo Alto, CA).

La especificidad del reconocimiento de fosfolípidos se confirmó adicionalmente mediante ensayos de competición con diversos liposomas. Los liposomas se prepararon a partir de soluciones de 5 mg de un solo fosfolípido (PS, PI, PC, CL, PA) en cloroformo. Las soluciones se secaron con nitrógeno para formar una fina capa en un matraz de vidrio con fondo redondo. Después se añadieron 10 ml de tampón de ensayo (0,1 M, pH 7,4) y los matraces se sometieron a ultrasonido cinco veces durante 2 minutos. El 3G4 (6,6 nM) se incubó previamente con 200 µg/ml de solución de liposomas durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se añadió a placas recubiertas con fosfolípidos. La capacidad de 3G4 para unirse a un fosfolípido inmovilizado en presencia o en ausencia de los diferentes liposomas se determinó como se ha descrito anteriormente.

Los estudios en curso mostraron que 3G4 es un anticuerpo monoclonal IgG₃ κ de ratón que reconoce específicamente a fosfolípidos aniónicos. Se une fuertemente a placas ELISA recubiertas con fosfolípidos aniónicos (PS, PA, CL, PI) en presencia de suero bovino al 5 % (FIG. 4) o suero humano. Se observó una unión semimáxima con 3G4 a concentraciones de 0,2 a 0,4 nM (FIG. 4). 3G4 no se une a fosfolípidos neutros (PE, PC y SM) en ELISA. Los anticuerpos monoclonales IgG₃ de ratón de control de especificidad irrelevante no se unieron. La unión se bloqueó mediante liposomas preparados a partir de fosfolípidos aniónicos, pero no de fosfolípidos preparados a partir de fosfolípidos neutros (FIG. 3).

3G4 se unió a placas ELISA revestidas con PS, PA y CL sintéticos que tenían cadenas laterales de dipalmitoilo saturadas (no oxidables) y a ácido silfosfatídico que tenía una sola cadena lateral de ácidos grasos. La unión no se vio afectada por la presencia de EDTA 5 mM, mostrando que la unión no es dependiente de Ca^{2+} .

En los estudios del presente ejemplo, en ausencia de suero, la unión a placas ELISA revestidas con fosfolípidos aniónicos se redujo un 90 %. La unión completa se restableció en presencia de β2-glicoproteína I humana 1 mg/ml. La unión no se vio afectada por protrombina, proteína C, proteína S, LDL oxidado, quinínogeno de alto peso molecular, quinínogeno de bajo peso molecular, factor XII, activador de plasminógeno tisular o anexina A5. Por tanto ahora se ha descubierto que el anticuerpo 3G4 reconoce fosfolípidos aniónicos en presencia de suero o β2-glicoproteína I. En el Ejemplo XXX se presentan los resultados de estudios posteriores relacionados con esta caracterización.

PS es el fosfolípido aniónico más abundante de la membrana plasmática y está segregado fuertemente en la cara interna de la membrana plasmática en células normales en condiciones normales. PS es un aminofosfolípido. PE es también un aminofosfolípido, pero PE es neutro, no aniónico. En lugar de funcionar como un aminofosfolípido neutro, PE se comporta de manera similar a PS y está normalmente estrechamente segregado en la cara interna de la membrana plasmática.

PI es otro fosfolípido aniónico principal de la membrana plasmática, que está adicionalmente fuertemente segregado en la cara interna en células normales en condiciones normales. PA y PG son fosfolípidos aniónicos minoritarios de la membrana plasmática (Hinkovska-Galcheva *et al.*, 1989), que también se segregan normalmente en la cara interna. CL es un fosfolípido aniónico presente en las membranas mitocondriales, y típicamente está ausente de la membrana plasmática.

PC y SM son fosfolípidos de la membrana plasmática neutros que contienen colina. Cada uno de PC y SM se localizan predominantemente en la cara externa en condiciones normales.

De acuerdo con el modelo de los inventores para la expresión diferencial de aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos entre vasos sanguíneos normales y tumorales, ninguno de los anticuerpos desarrollados usando el protocolo seleccionado reaccionó con los fosfolípidos neutros, PC y SM. El anticuerpo 1B9 fue específico para PS, mientras que 9D2, 1B12 y 3G4 se unieron a fosfolípidos aniónicos y aminofosfolípidos con las preferencias mostradas en la Tabla 4. El anticuerpo 9D2 también se describe en el Ejemplo VI.

Ejemplo V**La fosfatidilserina externalizada es un marcador global de vasos sanguíneos tumorales**

El presente ejemplo muestra que la exposición de PS se produce en células endoteliales en cada uno de los diez tumores sólidos diferentes que crecen en ratones y no está limitado al modelo tumoral L540 descrito en el Ejemplo II.

5 La PS externalizada *in vivo* se detectó inyectando un anticuerpo monoclonal dirigido contra PS por vía intravenosa en ratones portadores de diversos tipos de tumores humanos o murinos. Se muestra que los anticuerpos anti-PS se unen específicamente al endotelio vascular en los diez diferentes modelos tumorales. El endotelio vascular en órganos normales procedente de los mismos ratones no se tiñó. Un anticuerpo monoclonal de control del mismo isotipo no se localizará en ninguna de las células tumorales normales. También se identificaron con
10 inmunohistoquímica células apoptóticas, en las que solo algunas células endoteliales en tumores expresaban marcadores de apoptosis.

Por lo tanto el presente ejemplo muestra que las células endoteliales vasculares en tumores pero no en vasos normales externalizan PS. La mayoría de las células endoteliales tumorales que tienen PS expuesta no eran apoptóticas. Por tanto PS es un marcador abundante y accesible de vasculatura tumoral que puede usarse para la
15 formación de imágenes y terapia de vasos tumorales.

A. Tumores L540, H358 y HT29

El anticuerpo anti-PS usado en estos estudios fue el anticuerpo IgM monoclonal de ratón denominado 3SB (Ejemplo IV, Rote *et al*, 1993). 3SB se une principalmente a PS, pero también reacciona con PA, un fosfolípido aniónico relativamente minoritario con una distribución similar a la de PS. El anticuerpo anti-CL usado fue el anticuerpo IgM monoclonal de ratón denominado D11 (Ejemplo IV, Rote *et al*, 1993).
20

La exposición de PS sobre el endotelio vascular normal y tumoral se examinó primero en tres modelos tumorales animales: linfoma de Hodgkin humano L540, carcinoma de pulmón no microcítico humano NCIH358 (NSCLC) y carcinomas colorrectales humanos HT29. Para el desarrollo de los tumores *in vivo*, se inyectaron 2×10^6 células en el costado derecho de ratones SCID y se dejó que los tumores alcanzasen 0,8-1,2 cm de diámetro.

25 Se inyectó a los ratones portadores de tumores grandes (volumen por encima de 800 mm^3) por vía intravenosa a través de la vena caudal con 20 μg de cualquiera de los anticuerpos anti-PS o anti-CL. Una hora después de la inyección se anestesió a los ratones y su circulación sanguínea se perfundió con solución salina heparinizada. Los tumores y órganos normales se extirparon y se congelaron al instante para la preparación de criosecciones. La IgM de ratón se detectó usando IgM de cabra anti-ratón (μ , específica) - conjugada a HRP seguido de revelado con carbazol. Al menos se examinaron 10 campos al azar por sección a un aumento de 40 y se calculó el porcentaje promedio de vasos positivos.
30

Los anticuerpos anti-PS retornaron específicamente a la vasculatura de los tres tumores (HT29, L540 y NCI-H358) *in vivo*, indicado por la detección de IgM de ratón. En este primer estudio, los porcentajes promedio de los vasos teñidos en los tumores fueron de 80 % para HT 29, 30 % para L540 y 50 % para NCI-H358. Los vasos en todas las regiones de los tumores se tiñeron y hubo una tinción tanto para los capilares pequeños como para vasos más grandes.
35

No se observó tinción de vasos con anticuerpos anti PS en ninguno de los tejidos normales. En el riñón, los túbulos se tiñeron tanto en receptores anti-PS como anti-CL y esto se relaciona con la secreción de IgM a través de este órgano. Los anticuerpos anti-CL no se detectaron en ninguno de los tumores o tejidos normales, excepto en el riñón. Estos hallazgos indican que únicamente el endotelio tumoral se expone PS en el sitio externo de la membrana plasmática.
40

B. Tumores L540 pequeños y grandes

Para estimar el tiempo al cual la vasculatura tumoral pierde la capacidad de segregar PS en el lado interno de la membrana, se examinó la localización de anti-PS en tumores L540 que variaban en volumen de 140 a 1.600 mm^3 .

45 Los ratones se dividieron en 3 grupos de acuerdo con el tamaño de su tumor: 140-300, 350-800 y $800-1.600 \text{ mm}^3$. El Ac anti-PS no se detectó en tres ratones portadores de tumores L540 pequeños (hasta 300 mm^3). El Ac anti-PS localizado en 3 animales de 5 en el grupo de tamaño intermedio de tumores L540 y en todos los ratones (4 de 4) portadores de tumores L540 grandes (Tabla 5). El porcentaje de vasos sanguíneos positivos a PS de total (identificado por un marcador panendotelial Meca 32) fue de 10-20 % en el grupo intermedio de L540 y 20-40 % en
50 el grupo de tumores L540 grandes (Tabla 5).

TABLA 5

Externalización de PS detectada en tumores de tamaño mediano y grande

Tamaño del Tumor (mm ³)	nº de Tumores Positivos/Total*	% de Vasos Positivos a PS/Total†
350-800	3/5	10-20
850-1.600	4/4	20-40

*Los ratones portadores de tumores Cy L540 se dividieron en tres grupos de acuerdo con el tamaño del tumor. Se inyectaron 20 µg de anticuerpo anti-PS i.v. y se dejó circular durante 1 hora. Los anticuerpos de ratón se detectaron en secciones congeladas usando anti-IgM de ratón conjugado con peroxidasa.

†Número total de vasos sanguíneos se determinó usando el Ab panendotelial Meca 32. Los vasos positivos a PS y positivos a Meca se contaron en 4 campos por sección transversal de tumor. Se muestra el intervalo del % de vasos positivos a PS dentro del mismo grupo.

C. Tumores L540, H358, HT29, Colo26, B16 y 3LL

5 Usando los mismos anticuerpos anti-PS (3SB) y anti-CL (D11), la exposición de PS sobre endotelio tumoral y normal vascular se examinó en estudios adicionales usando modelos de tres tumores animales adicionales (seis en total): linfoma de Hodgkin humano L540, carcinoma de pulmón no microcítico humano NCIH358 (NSCLC), carcinomas colorrectales humanos HT29, carcinomas de colon de ratón Colo26, melanomas de ratón B16 y tumores de pulmón murino de ratón 3LL.

10 En estos estudios, los tumores se desarrollaron por vía subcutánea en ratones SCID y se dejaron alcanzar a un volumen de 0,4-0,7 cm³. Tres o más ratones se usaron por grupo. Se inyectaron anticuerpos IgM anti-PS o anti-CL de ratón (30 µg/ratón) por vía intravenosa en 200 µl de solución salina. Treinta minutos después, los ratones se sacrificaron, se exsanguinaron y su circulación sanguínea se perfundió con solución salina heparinizada. Los órganos principales y los tumores se recogieron y se congelaron al instante para la preparación de criosecciones. El
15 IgM de ratón se detectó usando IgM de cabra anti-rata (específica µ) conjugada con HRP, seguido por el desarrollo con carbazol.

Las secciones en serie de los tumores se tiñeron con un anticuerpo monoclonal, MECA 32, dirigido contra un marcador panendotelial de vasos de ratón. Se identificaron vasos positivos a PS morfológicamente y mediante su
20 tinción coincidente con anti-IgM de ratón y MECA 32. Se examinaron al menos 10 campos al azar por sección (0,317 mm²/campo) de una manera oculta mediante dos observadores independientes. El porcentaje de vasos positivos a MECA 32 que se tiñó positivamente para PS se calculó. Se examinaron tres tumores de cada tipo en cada uno de dos estudios distintos. Se calcularon los valores medios y los errores típicos (TE). La variación intertumoral en el número de vasos totales y positivos a PS en cada grupo de aproximadamente 10 %.

25 Los seis tumores en este estudio contenían vasos positivos a PS (Tabla 6A). La detección de PS por 3SB fue específica ya que no se observó tinción de endotelio tumoral con el anticuerpo anti-CL (Tabla 6A). No se observó localización vascular de los anticuerpos anti-PS o anti-CL en órganos normales distintos de riñones (tinción de los túbulos en receptores tanto anti-PS como anti-CL refleja la secreción de IgM a través de este órgano).

TABLA 6A

Localización específica de anticuerpos anti-PS en vasos tumorales

Tejido	Anti-PS*	Anti-CL
Tumor L540	19,3 ± 3,3	0
Tumor H358	15,6 ± 4,1	0
Tumor HT29	4,2 ± 1,6	0
Tumor B16	40,6 ± 5,4	0
Tumor 3LL	5,3 ± 3,7	0
Tumor Colo26	12,4 ± 2,4	0
Adrenal	0	0
Cerebro	0	0
Corazón	0	0
Riñón	0 [†]	0 [†]
Intestino	0	0

Tejido	Anti-PS*	Anti-CL
Hígado	0	0
Pulmón	0	0
Páncreas	0	0
Bazo	0	0
Testículos	0	0

*Los resultados se presentan como el porcentaje medio (\pm SE) de vasos positivos a PS de vasos teñidos con MECA 32 por campo de 0,317 mm². Se analizaron seis tumores de cada tipo. El número promedio de vasos positivos a MECA 32 por campo 0,317 mm² fue de 25, 21, 17, 18, 27 y 22 \pm 10 % de vasos para tumores L540, H358, HT29, B16, 3LL y Colo26, respectivamente

†La tinción tubular no específica de antígeno fue visible tanto en los receptores anti-PS como anti-CL.

En estos estudios, el porcentaje de vasos positivos a PS varía de 10 % en tumores Colo26 a 40 % en tumores B16. IgM anti-PS estaba presente en la superficie luminal de capilares y vénulas en todas las regiones de los tumores. Los vasos positivos a PS parecieron ser particularmente frecuentes en y alrededor de regiones de necrosis. Los vasos positivos normalmente no muestran anomalías morfológicas que eran obvias a microscopía lumínica. Vasos ocasionales localizados en áreas necróticas mostraron signos morfológicos de deterioro. El anticuerpo anti-PS (aunque no el anticuerpo anti-CL) también se localizó en células tumorales apoptóticas y necróticas.

Estos estudios controlados demuestran que PS se expone coherentemente en la superficie luminal de tumores endoteliales vasculares en varios tumores, pero no en tejidos normales, y que la expresión de la vasculatura tumoral no es específica del modelo.

D. La mayoría de los vasos tumorales positivos a PS no son apoptóticos

Se usó una técnica de doble marcado para identificar células endoteliales apoptóticas en secciones tumorales. Se identificaron células endoteliales con el marcador celular panendotelial MECA 32. Las células apoptóticas se identificaron con inmunohistoquímica usando dos marcadores independientes: una forma activa de caspasa-3, que identifica cambios citosólicos en células muertas (Krajewska *et al*, 1997), y ADN fragmentado, que identifica células que tienen alteraciones nucleares (Gavrieli *et al*, 1992).

La caspasa-3 activa se detectó mediante un anticuerpo específico anti-caspasa 3 de conejo (R&D, Minneapolis, MN) seguido por la incubación con IgG anticonejo conjugada con fosfatasa alcalina (AP, Pierce, Rockford, IL). Se analizaron otras secciones tumorales mediante ensayo Tunel (kit ApopTag™, Oncor, MD) usando conjugado de fosfatasa alcalina antidigoxigenina como un reactivo de detección. Las secciones se tiñeron doblemente para marcadores de apoptosis (rosa) y el marcador celular endotelial, MECA 32 (marrón). Ambos colores fueron claramente visibles en las mismas células, si los marcadores de células endoteliales y apoptóticas coinciden.

Las células endoteliales en cinco de los seis tipos de tumores (HT29, H358, B16, Colo26, L540) no mostraron ninguno de los marcadores apoptóticos (Tabla 7). El sexto tipo de tumor, 3LL, presentó algunas células endoteliales apoptóticas que se localizaron en áreas necróticas. Sin embargo, las células apoptóticas malignas eran comunes en todos los tipos de tumores. El porcentaje de células tumorales apoptóticas varió de 1-2 % en tumores L540 a 12,6-19,6 % en tumores 3LL.

TABLA 7

Expresión de marcadores apoptóticos en tumores

Tipo de tumor	caspasa-3 activa		Ensayo Tunel	
	Células tumorales (% de total)*	Vasos tumorales	Células tumorales (% de total)	Vasos tumorales
3LL	19,8 \pm 4,3	<1,0 [†]	12,6 \pm 3,6,	0
HT29	13,7 \pm 2,3	0	7,8 \pm 2,5	0
H358	5,8 \pm 2,0	0	4,3 \pm 1,6	0

Colo26	5,3 ± 1,5	0	4,1 ± 1,5	0
B16	4,2 ± 1,8	0	3,5 ± 1,6	0
L540	2,3 ± 1,0	0	1,6 ± 0,5	0

*El porcentaje de células tumorales o de vasos sanguíneos tumorales que eran positivos a cualquiera de caspasa-3 o Tunel se determinó en diez campos de alta fuerza por sección. Los campos se seleccionaron al azar junto con dos direcciones perpendiculares de los bordes a través del centro del tumor. Se presenta la media (± DT) del porcentaje de células o vasos positivos en tumores de 6 ratones.

†Vasos ocasionales (1 de >100) en el área necrótica de tumor 3LL presentó ambos marcadores de apoptosis.

E. Tumores MDA-MB-231 y Meth A

La exposición de PS sobre endotelio vascular tumoral también se examinó en tumores de mama humanos MDA-MB-231 que se desarrollaron en ratones y en fibrosarcoma Meth A de ratón que se desarrollaba subcutáneamente. El anticuerpo usado en este estudio fue el anticuerpo 9D2, generado como se describe en el Ejemplo IV, que es reactivo con fosfolípidos aniónicos.

Como se describe con detalle en el Ejemplo VI, 9D2 se localiza en vasos tumorales en tumores L540, NCI-H358 y B16, así como en modelos de tumor mamario MDA-MB-231 que crece ortotópicamente en los panículos adiposos mamarios de ratones SCID y fibrosarcoma Meth A de ratón que crece por vía subcutánea. 9D2 se localizó en vasos tumorales en los cinco tumores. El endotelio vascular en los tumores mostró tinción de membrana diferente. El anticuerpo 9D2 también se localiza en la membrana y en el citosol de células tumorales necróticas y apoptóticas. No se observó localización vascular del anticuerpo 9D2 en 9 de los 10 órganos normales que se examinaron, no observándose tinción específica de los túbulos en el riñón.

También se realizaron estudios de doble tinción en los cuales los ratones portadores de tumores mamarios ortotópicos MDA-MB-231 se inyectaron por vía i.v. anticuerpo 9D2 biotinilado y posteriormente secciones congeladas se tiñeron con MECA32 conjugado con FITC (Ejemplo VI). Aproximadamente el 40% de los vasos positivos a MECA 32 se unieron a 9D2.

F. Tumores MD-MBA-435

En un modelo de cáncer mamario adicional, la exposición de PS sobre endotelio vascular tumoral se examinó en células de cáncer mamario humano MDA-MB-435 en células que se desarrollaban en ratones. El anticuerpo usado en estos estudios es una versión quimérica del anticuerpo 3G4 (ch3G4). La generación del anticuerpo 3G4 se describe en el Ejemplo IV, y la producción del anticuerpo 3G4 quimérico se detalla en el Ejemplo XIX. La localización de ch3G4 en endotelio vascular tumoral en el modelo MDA-MB-435 se describe con más detalle en el Ejemplo XIX.

En resumen, los tumores se establecieron usando células MD-MBA-435s y se administraron versiones biotiniladas del anticuerpo 3G4 quimérico e IgG de control de especificidad irrelevante. Las secciones tumorales se tiñeron con estreptavidina conjugada con Cy3 para detectar las proteínas biotiniladas. La doble tinción con el anticuerpo MECA 32 seguido por anticuerpo secundario anti-IgG de rata etiquetado con FITC se realizó para detectar el endotelio vascular. Este método de detección marca las proteínas biotiniladas y el endotelio vascular usando rojo y verde de tal manera que las proteínas biotiniladas unidas al endotelio aparecen de color amarillo en una imagen convergente. Este estudio muestra una localización específica del anticuerpo 3G4 quimérico con respecto al endotelio vascular tumoral.

En estudios similares, la capacidad de 3G4 para localizarse selectivamente en vasos sanguíneos tumorales *in vivo* se determinó inyectando el anticuerpo i.p. o i.v. y exsanguinando a los ratones 1 h, 6 h o 24 h después. Las secciones congeladas de los tejidos normales y tumorales se tiñeron con respecto a la presencia de inmunoglobulina de ratón. Los ratones SCID que se había confirmado que no tenían inmunoglobulina circulatoria detectable se usaron para impedir la tinción de fondo. En estos estudios, las tinciones se tiñeron por contraste con anti CD31 de ratón para detectar el endotelio vascular y las imágenes se combinaron. La coincidencia de la tinción entre 3G4 y CD31 localizados se tomaron como una prueba de localización específica. La tinción coincidencia aparece de color amarillo, salvo dominada por una fluorescencia verde o roja particularmente intensa en esa región. La especificidad antigénica de la localización de los vasos se confirmó mediante la ausencia de tinción endotelial en tumores de ratones a los que se había inyectado anticuerpos de control del mismo isotipo, BBG3.

En estos estudios, 3G4 se localizó en un promedio de 40 ± 10 % de vasos sanguíneos tumorales después de inyección i.p. o i.v. en ratones portadores de tumores mamarios MDA-MB-435 ortotópicos, determinado por las imágenes combinadas. La localización de los vasos tumorales después de inyección i.p. de 3G4 era visible 1 hora después de inyección y era máxima 6 horas después de inyección, mientras que 3G4 inyectado i.v. dio una tinción

5 máxima al cabo de 1 hora después de la tinción. Los vasos marcados eran visibles en todas las regiones de los tumores, pero eran particularmente abundantes en y alrededor de regiones de necrosis. En los vasos más grandes, algunas veces se observó la heterogeneidad de la exposición de PS dentro de un solo vaso. Las regiones en las que no había 3G4 en el intersticio tumoral también eran visibles alrededor del endotelio de algunos vasos. Las células tumorales en y alrededor de las regiones de la necrosis tumoral se tiñeron. No se observó tinción de células tumorales necróticas en tumores de ratones a los que se había inyectado anticuerpo de control, BBG3, lo que indicaba que la localización en células tumorales necróticas en ratones a los que se había inyectado 3G4 era específica de antígeno.

10 La localización de 3G4 en el endotelio vascular en tejidos normales no se observó en ratones a los que se había inyectado i.v. 3G4 o anticuerpo de control (BBG3) 4 horas antes. Los tejidos normales examinados fueron: corazón, pulmón, hígado, vejiga urinaria, esófago, estómago, páncreas, duodeno, hilio, recto, riñón, glándula renal, bazo, cerebro, ojo, glándula salival y ovarios. Ninguno de los componentes vasculares de estos tejidos normales se tiñó.

G. Tumores marcados con RIP

15 Para el décimo modelo, se examinó la exposición de PS en endotelio vascular tumoral en un modelo de ratón transgénico "marcado con RIP" (RIP1-Marca 2) de carcinogénesis multiestado. En este modelo de ratón transgénico, cada ratón desarrolla tumores en islote del páncreas al cabo de 12-14 semanas de vida como resultado de la expresión del oncogén del antígeno T (Tag) SV40 en células beta productoras de insulina. Los tumores se desarrollan en fases múltiples de islotes hiperproliferativos y requieren un cambio angiogénico para progresar hacia malignidad. La metaloproteinasas-9 de matriz controla el cambio angiogénico (REF).

20 Se realizaron estudios de localización de 9D2 en el modelo RIP1-Tag2 en colaboración con el Dr. Donald McDonald, Profesor de Patología en la UCSF. Se inyectó 9D2 por vía intravenosa en ratones RIP1-Tag2 comenzando a las 10 semanas de vida, cuando todos los ratones tenían tumores sólidos pequeños, altamente vascularizados. Se realizó doble tinción de secciones tumorales gruesas (80 µm) para identificar 9D2 y CD31 localizados en tumores y en páncreas normal. Aproximadamente el 50 % de los vasos (positivos a CD31) en tumores pancreáticos habían localizado 9D2, mientras que los vasos en los islotes normales no se habían teñido. Los ratones a los que se había inyectado IgM de rata de control tenían una tinción débil y poco frecuente de vasos tumorales. También apareció alguna filtración de 9D2 e IgM de rata de control en tejidos extravasculares más allá del endotelio.

H. Resumen de los estudios de localización tumoral

30 Los inventores han estudiado ahora la localización de diversos anticuerpos anti-PS en vasos sanguíneos tumorales en ratones portadores de muchos tumores diferentes. Los resultados combinados de dichos estudios se resumen más adelante en la Tabla 6B. Los anticuerpo anti-PS se localizan en vasos sanguíneos tumorales en todos los tumores, mientras que no se observó localización vascular en órganos normales (Tabla 6B).

TABLA 6B

Localización de anticuerpos anti-PS en vasos tumorales y normales

Tejidos	Localización
Tejidos Tumorales	
Hodgkin L540	++
NSCLC H358	++
Colon HT29	+++
Colon colo26	++
Melanoma B16	+++
Pulmón 3LL	+++
MDA-MB-231	+++
MDA-MB-435	+++
Rip-Tag	+++
Tejidos Normales	
Adrenal	-
Cerebro	-
Corazón	-

Tejidos	Localización
Riñón	-
Intestino	-
Hígado	-
Pulmón	-
Páncreas	-
Bazo	-
Testículo	-

El presente ejemplo por lo tanto confirma que las células endoteliales vasculares en tumores externalizan PS y fosfolípidos aniónicos en su superficie luminal, donde no pueden unirse mediante anticuerpos anti-PS *in vivo*. PS está ausente de la superficie externa de células endoteliales vasculares en tejidos normales, lo que indica que los anticuerpos reconocen PS, anexina V y otros ligandos que pueden usarse para administrar fármacos citotóxicos, coagulantes y radionúclidos para la formación de imágenes selectiva o destrucción de vasos en tumores sólidos.

El endotelio tumoral positivo a PS pareció, en mayor medida, ser viable en los tumores usados en este estudio. No presenta marcadores de apoptosis, está morfológicamente intacto y es metabólicamente activo, indicado mediante su expresión de VCAM-1, E-selectina y otras proteínas renovadas rápidamente. Aunque a menudo se considera como indicador de apoptosis, la exposición de PS se ha observado en diversos tipos de células viables, incluyendo células neoplásicas (Rao *et al*, 1992), (Utsugi *et al*, 1991) plaquetas activadas (Rote *et al*, 1993) y trofoblastos embrionarios a diversas fases de migración, invasión de matriz y fusión (Adler *et al*, 1995).

La ausencia de correlación entre la exposición de PS y compromiso con la muerte celular no se ha observado en células B de linfoma preapoptóticas que reestablecen la asimetría de PS y crecen normalmente después de la retirada de estímulos proapoptóticos (Hammill *et al*, 1999). En células viables normales, la exposición de PS está probablemente desencadenada por acontecimientos en superficie, tales como interacciones entre ligando-receptor, que inducen flujos de Ca^{2+} en las células (Dillon *et al*, 2000). Los flujos de Ca^{2+} activan la escramblasa (Zhao *et al*, 1998) e inhiben simultáneamente la aminofosfolípido translocasa (Comfurius *et al*, 1990).

La PS en vasos tumorales es una diana atractiva para la formación de imágenes del cáncer o terapia por diversas razones: es abundante (aproximadamente 3×10^6 moléculas por célula); se encuentra en la superficie luminal del endotelio tumoral, que es directamente accesible para la unión mediante agentes de direccionamiento vascular en la sangre; se presenta en un alto porcentaje de células endoteliales tumorales en diversos tumores sólidos y está ausente del endotelio en todos los tejidos normales examinados hasta ahora. Los anticuerpos no conjugados, agentes de direccionamiento vascular y agentes de formación de imágenes dirigidos contra PS en la vasculatura tumoral pueden por lo tanto usarse para la detección y tratamiento de cáncer en seres humanos.

Ejemplo VI

Los fosfolípidos aniónicos se exponen sobre la superficie de vasos sanguíneos tumorales

Los fosfolípidos aniónicos están muy ausentes de la cara externa de la membrana plasmática de las células de mamífero en condiciones normales. La exposición de fosfatidilserina, por ejemplo, sobre la superficie celular se produce durante la apoptosis, necrosis, lesión celular, activación de células y transformación neoplásica. El presente ejemplo muestra que los fosfolípidos aniónicos están regulados positivamente sobre la vasculatura tumoral *in vivo*, demostrando por la localización de un anticuerpo específico y ligando natural que se une a fosfolípidos aniónicos.

Un anticuerpo monoclonal, 9D2, que reconoce específicamente a fosfolípidos aniónicos, se inyectó en ratones portadores de diversos tumores ortotópicos o ectópicos. Otros ratones recibieron anexina V, un ligando natural que se une a fosfolípidos aniónicos. Tanto 9D2 como la anexina V se localizan específicamente en el endotelio vascular en todos los tumores y también en células tumorales y en células de necrosis circundantes. Entre el 15 y el 40 % de las células endoteliales en los vasos tumorales se tiñeron. No se detectó localización en endotelio normal.

Diversos factores y condiciones asociadas a tumor conocidas hasta ahora en el microentorno tumoral se examinaron con respecto a su capacidad para causar la exposición de fosfolípidos aniónicos en células endoteliales cultivadas, como se juzga mediante la unión de 9D2 y anexina V. La hipoxia/reoxigenación, acidez, trombina y citocinas inflamatorias inducen exposición de fosfolípidos aniónicos. El peróxido de hidrógeno también es un fuerte inductor. El tratamiento combinado con citocinas inflamatorias e hipoxia/reoxigenación tuvo efectos mayores a los aditivos. La exposición demostrada de los fosfolípidos aniónicos sobre el endotelio tumoral *in vivo* está por tanto posiblemente causada por lesión y activación por citocinas y especies de oxígeno reactivas. Independientemente del mecanismo, los fosfolípidos aniónicos son marcadores de vasos tumorales que ahora pueden usarse para el direccionamiento de vasos tumorales, la formación de imágenes y terapia.

A. Materiales y métodos

1. Materiales

Se obtuvo Na¹²⁵I de Amersham (Arlington Heights, EL). Se obtuvo medio de cultivo tisular Eagle modificado de Dulbecco y Ca²⁺ y Mg²⁺ que contenía PBS Dulbecco de Gibco (Grand Island, NY). El suero de ternero fetal se obtuvo en Hyclone (Logan, Utah). La L- α -fosfatidilserina, L- α -fosfatidilcolina, cardiolipina, L- α -fosfatidilemanolamina, L- α -fosfatidilinositol, esfingomielina, ácido fosfátidico, fosfatidilglicerol, O-fenilendiamina, peróxido de hidrógeno y trombina procedían de Sigma (St. Louis, MO). Las placas de fondo plano de 24 pocillos se obtuvieron de Falcon (Becton Dickinson and Co., Lincoln Park, NJ).

El factor de crecimiento de hepatocitos recombinante (HGF o factor de diseminación) y la actinomicina D eran de Calbiochem (San Diego, CA). La interleucina-1 alfa, beta murina recombinante y factor alfa de necrosis tumoral (TNF α) se adquirieron en R&D Systems (Minneapolis, MN). El interferón de Tipo I Universal (proteína híbrida que sustituye todos los tipos de interferones) se adquirió en PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, NJ). El factor de crecimiento endotelial vascular recombinante humano 121 (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas humano-BB, la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-8 (IL-8), la interleucina-10 (IL-10) y el factor 2 de crecimiento de fibroblastos humano (FGF-2) se adquirieron en PeproTech (Rocky Hill, NJ).

2. Anticuerpos

MECA 32, un anticuerpo celular panendotelial de ratón se obtuvo a través del Dr. E. Butcher (Stanford University, CA) y sirvió como un control positivo para estudios inmunohistoquímicos. Se han publicado detalles de este anticuerpo (Leppink *et al*, 1989). La inmunoglobulina de rata anti conejo y los anticuerpos secundarios de cabra anti ratón y anti rata conjugados a peroxidasa del rábano (HRP) se adquirieron en Daco (Carpintería, CA) o en Jackson ImmunoResearch Labs (West Grove, PA).

El anticuerpo 9D2 usado en estos estudios se generó como se describe en el Ejemplo IV. 9D2 es un anticuerpo monoclonal de rata reactivo con fosfolípidos aniónicos. La caracterización adicional de la especificidad del fosfolípido de 9D2 se proporciona en la sección de resultados de este ejemplo.

3. Células

Las células de linfoma de Hodgkin L540Cy, procedentes de un paciente con enfermedad terminal, las proporcionó el Prof. V. Diehl (Colonia, Alemania). El carcinoma de pulmón no microcítico humano NCI-H358 lo proporcionó el Dr. Adi Gazdar (Southwestern Medical Center, Dallas, TX). El fibrosarcoma de ratón Meth A y el carcinoma mamario humano MDA-MB-231 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD). La línea de endotelioma de cerebro de ratón, bEnd.3, la proporcionó el Prof. Werner Risau (Max Plank Institution, Munich, Alemania) y se mantuvo en DMEM con FBS al 10 %. Las células endoteliales aórticas de bovino a adulto (ABAE) se adquirieron en Clonetics (San Diego, CA; Walkerville, MD). Las células ABAE se mantuvieron en DMEM con suero al 10 % y 2 ng/ml de bFGF.

4. Cultivo tisular

Las células bEnd.3, ABAE y células tumorales excepto las de linfoma L540Cy se mantuvieron en DMEM complementado con suero de ternero fetal al 10 %, L-glutamina 2 mM, 2 unidades/ml de penicilina G y estreptomycin 2 μ g/ml. Las células L540Cy se mantuvieron en RPMI 1640 que contenía los mismos aditivos. Las células se subcultivaron una vez a la semana. La tripsinización de las células bEnd.3 se realizó usando tripsina 0,125 % en PBS que contenía EDTA al 0,2 %. Para los estudios *in vitro*, las células endoteliales se sembraron a una densidad de 10×10^3 células/ml en 1 ml de medio de cultivo en placas de 24 pocillos y se incubaron 48-96 horas antes de usarse en los ensayos. El medio se renovó 24 horas antes de cada estudio.

5. Reactividad con fosfolípidos inmovilizados en plástico

Los fosfolípidos se disolvieron en n-hexano a una concentración de 50 μ g/ml. Se añadieron 100 μ l de esta solución a pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de la evaporación del disolvente en aire, las placas se bloquearon durante 2 horas con suero bovino fetal al 10 % diluido en DPBS que contenía Ca²⁺ 2 mM (tampón de unión).

El anticuerpo 9D2 o la anexina V se diluyeron en el tampón de unión en presencia de suero al 10 % a una concentración inicial de 6,7 nM. Se prepararon diluciones en serie de factor dos en placas (100 μ l por pocillo). Después, las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y el 9D2 y anexina V se detectaron mediante una IgM de cabra anti rata conjugada a HRP y de conejo anti anexina V humana seguido por IgG de cabra anti conejo conjugada a HRP (todos diluidos a 1:1000), respectivamente. Se detectaron reactivos secundarios usando sustrato cromogénico OPD seguido por la lectura de las placas a 490 nm usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Palo Alto, CA).

La especificidad de la unión del anticuerpo 9D2 se validó usando IgM de rata de control de especificidad irrelevante

(Pharmingen, San Diego, CA). La especificidad de la unión de la anexina V a fosfolípidos, que es dependiente de Ca^{2+} , se determinó diluyendo el reactivo en el DPBS que contenía EDTA 5 mM. Los controles negativos adicionales consistían en el lavado de las placas con el tampón de unión que contenía 0,2 % de un detergente Tween 20. Este tratamiento extrae los lípidos, eliminando de este modo el fosfolípido que se absorbió en el plástico. Ninguno del anticuerpo 9D2 ni anexina V se unen a placas lavadas con detergente.

6. Detección de fosfolípidos aniónicos sobre la superficie de células endoteliales cultivadas

Las células endoteliales se cultivaron hasta alcanzar aproximadamente una confluencia del 70 %. Para inducir la exposición de PS, las células se trataron con H_2O_2 (200 μM) durante 1 hora a 37 °C. Los portaobjetos de control y tratados se lavaron con DPBS que contenía Ca^{2+} y Mg^{2+} y se fijaron con 0,25 % de glutaraldehído diluido en el mismo tampón. El exceso de grupos aldehído se extinguió mediante la incubación con 50 mM de NH_4Cl durante 5 minutos. Para examinar el efecto de los detergentes y de los disolventes orgánicos sobre la detección de fosfolípidos, algunos portaobjetos se incubaron previamente con acetona (5 min) o con PBS que contenía Tritón™ X-100 al 1 % (v/v).

Las células se lavaron con DPBS (que contenía Ca^{2+} , Mg^{2+} y gelatina al 0,2 % (p/v)) y se incubaron con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anexina V biotinilada (Pharmingen, San Diego, CA) o con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo 9D2. Después de 2 horas de incubación, las células se lavaron con tampón de gelatina el 0,2 % y se incubaron con estreptavidina-HRP (dilución 1:500). Se usó IgM de rata de especificidad irrelevante y solo estreptavidina como controles negativos en estos estudios. Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente. La actividad de HRP se midió añadiendo O-fenilendiamina (0,5 mg/ml) y peróxido de hidrógeno (0,03 % p/v) en tampón de fosfato-citrato, pH 5,5. Después de 15 minutos, 100 μl de sobrenadante se transfirieron a placas de 96 pocillos, 100 μl de H_2SO_4 0,18 M se añadieron y se midió la absorbancia a 490 nm. Como alternativa, las células positivas a PS se detectaron mediante la adición de sustrato de carbazol, dando como resultado un precipitado rojo pardo insoluble. Cada estudio se realizó por duplicado y se repitió al menos dos veces.

7. Inhibición de 9D2 y anexina V uniéndose a fosfolípidos mediante liposomas

La especificidad del reconocimiento de fosfolípidos se confirmó adicionalmente por ensayos de competición con diversos liposomas. Se prepararon liposomas de soluciones de 5 mg de un solo fosfolípido en cloroformo. Las soluciones se secaron con nitrógeno para formar una fina capa en un matraz de vidrio de fondo redondo. Diez ml de tampón de ensayo (0,1 M, pH 7,4) se añadieron después y los matraces se sometieron a ultrasonido cinco veces durante 2 minutos. 9D2 o anexina V (6,66 nM) se incubaron previamente con 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de solución liposomal durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se añadió a placas recubiertas con fosfolípidos o a monocapas de células endoteliales. La capacidad de 9D2 para unirse a un fosfolípido inmovilizado o superficie celular en presencia o ausencia de los diferentes liposomas se determinó como se ha descrito anteriormente.

8. Competición de 9D2 y anexina V por la unión a PS inmovilizado

El anticuerpo biotinilado 9D2 y la anexina V se prepararon incubando proteínas purificadas con un exceso molar 10 veces de N-hidroxisuccinimida biotina (Sigma, MO) durante 1 hora a temperatura ambiente. La biotina libre se retiró por diálisis frente a PBS. El procedimiento de biotinilación no afecta a la capacidad de unión de PS de ninguna proteína. Para estudios de competición, las proteínas no modificadas y biotiniladas se mezclaron previamente con un exceso molar 10 veces de proteínas no modificadas. Después las mezclas se añadieron a placas recubiertas con PS. Los reactivos unidos se detectaron mediante conjugado estreptavidina-HRP diluido a 1:1000. La unión a PS de cada reactivo en ausencia de un competidor se tomó como valor al 100 %.

9. Crecimiento de tumores implantados por vía subcutánea

Para estudios de localización, se inyectaron 2×10^7 células de linfoma de Hodgkin humano L540 o 1×10^7 células de otros tipos de tumores por vía subcutánea en el costado derecho de ratones SCID (Charles River, Wilmington, MA). Se dejó que los tumores alcanzasen un volumen de 0,4-0,7 cm^3 . Se utilizó un mínimo de tres animales por grupo. Los estudios se realizaron por duplicado al menos tres veces.

10. Modelo ortotópico de carcinoma de mama humano MDA-MB-231

Los ratones hembra *nu/nu* o SCID se adquirieron en Charles River. Las células de carcinoma mamario humano MDA-MB-231 se implantaron en el pániculo adiposo mamario de acuerdo con un protocolo publicado (Price, 1996). En resumen, los ratones se anestesiaron y se realizó una incisión de 5 mm en la piel sobre la parte torácica lateral. El pániculo adiposo mamario se expuso para garantizar el sitio correcto de inyección de 1×10^7 células MDA-MB-231 resuspendidas en 0,1 ml de solución salina.

11. Detección de fosfolípidos aniónicos en ratones portadores de tumor *in vivo*

Las técnicas inmunohistoquímicas en las que 9D2 o anexina V se aplican directamente a secciones de tejidos congelados no discriminan entre fosfolípidos aniónicos en la cara interna y en la cara externa de la membrana plasmática. Para detectar fosfolípidos externamente posicionados, se realizaron métodos esencialmente como se ha

descrito anteriormente (Ejemplo V; Ran *et al*, 1998). Se inyectó a ratones SCID portadores de tumor por vía intravenosa cualquiera de 50 µg de 9D2 o anticuerpo 9D2 biotinilado o 100 µg de anexina V biotinilada. Sesenta minutos después los ratones se sacrificaron y su circulación sanguínea se exsangüinó y se perfundió con solución salina heparinizada como se ha descrito anteriormente (Burrows *et al*, 1992). Todos los órganos principales y los tumores se recogieron y se ultracongelaron para preparación de criosecciones.

Las secciones se bloquearon con PBS que contenía suero al 10 %. Para impedir la pérdida de fosfolípidos durante el procesamiento del portaobjetos, los detergentes y los disolventes orgánicos se omitieron de los tampones de lavado y bloqueo. La IgM de rata se detectó usando IgM de cabra anti rata (específica µ)-conjugada a HRP seguido por revelado con carbazol o DAB (Fries *et al*, 1993). Los reactivos biotinilados se detectaron mediante estreptavidina conjugada con HRP.

Las secciones tumorales procedentes de ratones a los que se había inyectado solución salina o IgM de rata de especificidad irrelevante sirvieron como controles negativos. Los controles adicionales consistían en la incubación de portaobjetos en solución Tritón al 1 % o en acetona durante 10 minutos. Estos tratamientos extraen fosfolípidos. No se detectó señal en estas condiciones. El número de vasos positivos por un campo de alta resolución se determinó a un aumento de 100. Al menos se examinaron 10 campos por sección y se calculó el porcentaje promedio de vasos positivos. La tinción de las secciones mediante este método con respecto a la presencia de 9D2 o anexina V detecta células que tiene fosfolípidos aniónicos externalizados que eran accesibles para la unión por reactivos *in vivo*.

12. Identificación y cuantificación de vasos tumorales positivos a PS

Se identificaron estructuras con el anticuerpo 9D2 o anexina V localizados como vasos sanguíneos mediante su aspecto morfológico en secciones teñidas con DAB y tinción coincidente con el marcador celular panendotelial MECA 32 en secciones en serie de tejidos congelados. La cuantificación sobre secciones teñidas con DAB se realizó contando vasos teñidos con MECA 32, 9D2 o anexina V en secciones en serie de un tumor. Seis portaobjetos de cada tipo tumoral procedían de 6 ratones a los que se había inyectado anticuerpo 9D2, IgM de rata de control o anexina V examinados. Al menos 10 campos al azar por sección (0,317 mm²/campo) se puntuaron de una manera enmascarada por dos observadores independientes. Se calcularon los números medios y errores típicos de los vasos teñidos con 9D2, anexina V o MECA 32. El número medio de vasos positivos a 9D2 o anexina V determinado en cada grupo de tipo tumoral se comparó con el número medio de vasos positivos a MECA 32 del mismo grupo tumoral. Se calculó el porcentaje de vasos positivos a 9D2 o anexina V.

En estudios posteriores, se inyectó a ratones portadores de tumores MDA-MB-231 (0,3-0,7 cm³ de volumen) por vía intravenosa 50 µg de 9D2 biotinilado, IgM de control o anexina V (seis ratones por grupo). Los reactivos biotinilados se incubaron primero con conjugado de estreptavidina-Cy3, se lavaron en PBS, se incubaron después con anticuerpo MECA 32 seguido por el anticuerpo secundario IgG anti rata marcado con FITC. Se capturaron imágenes simples tomadas con filtros apropiados para la fluorescencia de Cy3 (rojo) y de FITC (verde) respectivamente, mediante una cámara digital y se transfirieron a un ordenador. Las imágenes de 10 campos al azar (0,317 mm²/campo) demostraron un color amarillo (un producto de la fluorescencia verde y rojo combinada) se solaparon con la ayuda del programa informático Metaview. Se usó el mismo método para analizar tumores de ratones a los que se había inyectado IgM de rata de control o solución salina. El porcentaje de vasos con 9D2 o anexina V localizado se calculó de la siguiente manera: número medio de vasos amarillos por campo dividido entre el número medio de vasos verdes (total) multiplicado por 100.

B. Resultados

1. Especificidad de fosfolípidos de anticuerpo 9D2 y anexina V

Los anticuerpos 9D2 reconocen específicamente a fosfolípidos aniónicos (PS, PA, CL, PI, PG) y no tienen reactividad significativa con fosfolípidos neutros (PE, PC y SM) en ELISA (Tabla 8). El orden de fuerza de unión de 9D2 a fosfolípidos en ELISA fue PA>PS=CL>PG=PI. La unión específica de antígeno dado que no se observó unión con diversas IgM de rata de control de especificidad irrelevante. La unión de 9D2 a cualquiera de los fosfolípidos aniónicos adsorbidos en placas ELISA se bloqueó con liposomas preparados a partir de cualquiera de los fosfolípidos aniónicos, pero no con liposomas preparados de cualquiera de los fosfolípidos neutros.

TABLA 8

Especificidad de fosfolípidos de 9D2 y anexina V

Fosfolípido		Abundancia y localización en la membrana plasmática en condiciones normales ^a	CE ₅₀ de unión (µM)	
Nombre	Tipo		9D2	Anexina V
PS	PL amino aniónico	PL principal (15 %), localizado en el lado interno	12	100
PA	PL aniónico	PL minoritario (menor del 1 %)	2	100

PG	PL aniónico	PL minoritario (menor del 1 %)	100	250
PI	PL aniónico	PL mayoritario (7 %), principalmente localizado en el lado interno	100	50
CL	PL aniónico	Ausente de la membrana plasmática	15	130
PE	PL amino neutro	PL mayoritario (22 %), principalmente localizado en el lado interno	>8000	100
SM	PL colina neutro	PL mayoritario (9 %), localizado en el lado externo	>8000	>8000
PC	PL colina neutro	PL mayoritario (46 %), localizado en el lado externo	>8000	>8000

^aPorcentaje de fosfolípidos totales, tomados de Fridriksson, *et al*, 1999. Los porcentajes pueden variar a partir de diferentes tipos de células.

5 La anexina también se unió a fosfolípidos aniónicos pero esta unión era menos específica que la de 9D2 ya que también se unía fuertemente a fosfolípidos neutros PE. Para el orden de fuerza de unión de anexina V a fosfolípidos en ELISA fue PI>PS=PE=PA=CL>PG (Tabla 8). Estos hallazgos para la anexina V son coherentes con los datos previos (Andree *et al*, 1990).

La unión de 9D2 no se vio afectada por la presencia de EDTA 5 mM, lo que mostraba que no requería Ca²⁺ para la unión a fosfolípidos aniónicos. Sin embargo, la unión de anexina V a fosfolípidos aniónicos se anuló en presencia de EDTA 5 mM, como se esperaba a partir de la dependencia conocida de Ca²⁺ por la unión a fosfolípidos aniónicos o a PE (Schlaepfer *et al*, 1987; Blackwood y Ernst, 1990).

10 Ni 9D2 ni anexina V se unieron a placas ELISA que se habían revestido con fosfolípidos pero después lavado con Tween al 0,2 % en solución salina, confirmando que su unión era a los fosfolípidos absorbidos. El 9D2 y la anexina V no se unieron de manera detectable a heparina, heparán sulfato o a ADN mono o bicatenario.

2. El anticuerpo 9D2 y la anexina V no bloquean de manera cruzada ninguna de las otras uniones a PS

15 Para examinar si el anticuerpo 9D2 y la anexina V competía por la unión a PS, se realizaron estudios de bloqueo cruzado usando proteínas biotiniladas en placas recubiertas con PS. La unión del anticuerpo 9D2 y la anexina V biotinilada se bloqueó mediante un exceso molar 10 veces de 9D2 y anexina V no modificados, respectivamente (Tabla 9). Sin embargo, la anexina V no modificada no afectó a la capacidad de 9D2 biotinilado para unirse a la placa PS. Del mismo modo, la adición del anticuerpo 9D2 no modificado no alteró la capacidad de la anexina V biotinilada para unirse a la placa PS (Tabla 9).

20

TABLA 9

9D2 y anexina V no bloquean en cruzado la unión a PS

Proteína de unión a PS	Competidor ^a	Unión (% Control) ^b
Anexina V biotinilada	Anexina V	8 %
9D2 biotinilado	Anexina V	93 %
Anexina V biotinilada	9D2	95 %
9D2 biotinilado	9D2	5 %

^aLa anexina V o el anticuerpo 9D2 se mezclaron previamente en un exceso molar de 10 veces sobre los reactivos biotinilados. La unión de los reactivos biotinilados contra PS en placas de microtitulación se detectó mediante estreptavidina-HRP.

^bReactividad de reactivos biotinilados en ausencia de un competidor se tomó como 100 %. Los valores medios de determinaciones por triplicado se presentan. La DT es menor de 10 % del valor medio.

25 Estos resultados indican que el anticuerpo 9D2 y la anexina V no bloquean de manera cruzada entre sí la unión a placas recubiertas con PS, bien porque reconocen diferentes epítomos en la molécula PS o conformaciones diferentes de PS adsorbido en plástico.

3. Unión a fosfolípidos aniónicos externalizados en superficies celulares

La unión del anticuerpo 9D2 y la anexina V a superficies celulares se examinó usando células de endotelioma bEnd.3 de ratón o células ABAE bovinas. Ni 9D2 ni anexina V se unieron a monocapas no permeabilizadas de ningún tipo celular en condiciones quiescentes. Esto indica que la mayoría de los fosfolípidos aniónicos de la membrana plasmática están normalmente secuestrados en el dominio citosólico. Sin embargo, se observó una fuerte tinción cuando las células se preincubaron con TNF α y actinomicina D en condiciones que causaban la apoptosis en el 90-100 % de las células endoteliales.

Para confirmar que 9D2 y anexina V estaban unidas a fosfolípidos en las superficies celulares, se incubaron células bEnd.3 tratadas con H₂O₂ con anticuerpo 9D2 o anexina V en presencia o ausencia de diversos liposomas competidores. Los fosfolípidos aniónicos comenzaron a exponerse sobre células no apoptóticas viables bEnd.3 cuando se trataban previamente con una concentración subtóxica (100-200 μ M) de H₂O₂ (Ran *et al*, 2002a).

La unión del anticuerpo 9D2 a células bEnd.3 tratadas con H₂O₂ se inhibió por liposomas que contenían fosfolípidos aniónicos pero no liposomas que contenían fosfolípidos neutros. La magnitud de la inhibición de la unión de 9D2 a células varió en el orden PA>PS>CL>PG>PI, en estrecho acuerdo con los resultados obtenidos usando fosfolípidos inmovilizados en plástico. De manera similar, la unión de anexina V a células tratadas con H₂O₂ se bloqueó por liposomas que contenían PS, PA, PE, CL y, en menor medida, PI y PG. Los liposomas que contenían SM o PC no bloquearon la unión de anexina V a células, según los resultados obtenidos usando fosfolípidos inmovilizados en plástico.

Estos resultados confirman que 9D2 se une a fosfolípidos aniónicos en las células endoteliales tratadas con H₂O₂ mientras que anexina V se une a PE además de a fosfolípidos aniónicos.

4. Detección de fosfolípidos aniónicos externalizados en células *in vivo*

Las técnicas inmunohistoquímicas directas en las cuales 9D2 o anexina V se aplican directamente a secciones de tejidos congelados no discriminan entre fosfolípidos aniónicos en la cara interna y en la cara externa de la membrana plasmática. Para detectar fosfolípidos posicionados externamente, 9D2 y anexina V se inyectaron por vía intravenosa en ratones portadores de tumores y se determinó la localización en los vasos tumorales mediante inmunohistoquímica indirecta.

Los ratones portadores de diversos tipos de tumores sólidos recibieron una inyección intravenosa de anticuerpo 9D2 o de anexina V biotinilada, una hora después se exsanguinaron y los tumores y los tejidos normales se extirparon y se prepararon secciones congeladas. Las secciones congeladas de los tejidos se cortaron y se tiñeron con IgM anti rata marcada con HRP o con estreptavidina marcada con HRP para determinar a qué células se unían 9D2 y anexina V después de la inyección. Los vasos sanguíneos se identificaron morfológicamente, y a partir de su tinción positiva mediante el anticuerpo celular panendotelial MECA 32, en secciones en serie.

5. Biodistribución del anticuerpo 9D2 y anexina V en ratones portadores de tumores

El anticuerpo 9D2 y la anexina V se localizaron en los vasos tumorales en los cinco tumores incluidos en este estudio (Tabla 10). Los tumores fueron: cáncer mamario humano MDA-MB-231 que se desarrolla ortotópicamente en los panículos adiposos mamaros de ratones SCID; tumor de Hodgkin humano L540 que se desarrolla subcutáneamente, NSCLC NCI-H358 que se desarrolla subcutáneamente; melanoma B16 de ratón que se desarrolla subcutáneamente y fibrosarcoma Meth A de ratón que se desarrolla subcutáneamente.

TABLA 10
Localización específica de 9D2 y anexina V contra vasos tumorales

Tejido	Anticuerpo 9D2 ^a	Control IgM de rata	Anexina V ^b
Tumores			
MDA-MB-231	40,6 \pm 5,4	-	45,3 \pm 5,6
L540cy	19,3 \pm 3,3	-	16,7 \pm 3,9
NCI-H358	15,6 \pm 4,1	-	ND
B16	23,4 \pm 4,5	-	21,3 \pm 6,6
Meth A	25,7 \pm 6,8	-	ND
Normal			
Adrenal	-	-	-
Cerebro	-	-	-

Corazón	-	-	-
Riñón	- ^c	- ^c	-
Intestino	-	-	-
Hígado	-	-	-
Pulmón	-	-	-
Páncreas	-	-	-
Bazo	-	-	-
Testículos	-	-	-

^aLocalización de anticuerpo 9D2 y control IgM de rata en ratones portadores de tumor se determinó inyectando el anticuerpo (50 µg), perfundiendo la circulación sanguínea de los ratones con solución salina y detectando el anticuerpo en secciones de los tejidos usando anti-IgM de ratón conjugado con peroxidasa. Los resultados se presentan como la media (± DT) porcentaje de vasos positivos a PS de vasos teñidos con MECA 32 por campo de 0,317 mm². Se analizaron seis muestras de cada tipo. El número promedio de vasos positivos a MECA 32 por un campo de 0,317 mm² fue 23, 25, 21, 18 y 19 ± 10 vasos para MDA-MB-231, L540cy, H358, B16 y tumores Meth A, respectivamente

^bLa localización de anexina V se determinó inyectando anexina V biotinilada seguido por la detección sobre secciones congeladas usando conjugado de peroxidasa con estreptavidina.

^cLa tinción tubular no específica de antígeno era visible tanto en 9D2 como en los receptores de anticuerpo control.

9D2 y la anexina V dieron esencialmente los mismos patrones de tinción. La localización del anticuerpo 9D2 en los vasos tumorales era específica dado que no se observó tinción de endotelio tumoral con IgM de rata de especificidad irrelevante. Supuestamente, la filtración de IgM de rata de control fuera de los vasos tumorales se produjo hasta cierto grado, aunque la tinción de IgM extracelular no era difusa o demasiado débil para discernir mediante inmunohistoquímica indirecta.

No se observó localización vascular del anticuerpo 9D2 o de anexina V en nueve de los diez órganos normales que se examinaron (Tabla 10). En el riñón, se observó que la tinción de túbulo parecía que no era específica de antígeno. Los túbulos se tiñeron tanto con 9D2 como con IgM de rata de control, supuestamente debido a la secreción de IgM o sus metabolitos a través de este órgano. Los ovarios, un sitio de angiogénesis fisiológica, no se examinaron.

El porcentaje de vasos positivos a 9D2 y anexina V varió del 40 % en tumores MDA-MB-231 al 15 % en tumores H358. Los vasos positivos a fosfolípidos aniónicos estaban presentes en la superficie luminal de capilares y vasos en todas las regiones de los tumores, pero eran particularmente frecuentes en y alrededor de regiones de necrosis. La mayoría de los vasos positivos a fosfolípidos aniónicos no mostró anomalías morfológicas que eran obvias por microscopía óptica. Vasos ocasionales, particularmente los localizados en áreas necróticas, mostraron signos morfológicos de deterioro. El anticuerpo 9D2 y la anexina V también se localizaron en células tumorales necróticas y apoptóticas mientras que la localización de IgM de control no era detectable.

Estos hallazgos demuestran que los fosfolípidos aniónicos están presentes en la superficie luminal de las células endoteliales vasculares en diversos tumores pero no en tejidos normales.

6. Estudios de doble tinción

También se realizaron estudios de doble tinción en los que se inyectó a ratones portadores de tumores mamarios ortotópicos MDA-MB-231 por vía intravenosa con anticuerpo 9D2 biotinilado, IgM de control biotinilada o anexina V biotinilada. Una hora más tarde, los ratones se exsanguinaron, y sus tumores se extirparon y las secciones congeladas se cortaron. Las secciones tumorales se tiñeron después con estreptavidina conjugada con Cy3 para detectar las proteínas biotiniladas y con MECA 32 conjugado con FITC para detectar el endotelio vascular. Este método de detección marca las proteínas biotiniladas y el endotelio vascular con rojo y verde. Cuando las proteínas biotiniladas están unidas al endotelio, la imagen convergente aparece de color amarillo.

En estos estudios, la anexina V y el 9D2 biotinilados aparecieron principalmente unidos al endotelio vascular, debido a sus modelos de tinción convergían con el de MECA 32. Aproximadamente el 40 % de los vasos positivos a MECA 32 se unían a 9D2 y anexina V, en estrecho acuerdo con los resultados obtenidos por inmunohistoquímica indirecta. Sin embargo, la filtración de las proteínas biotiniladas en el intersticio tumoral se detectó mediante doble tinción, mientras que no era aparente mediante inmunohistoquímica indirecta.

Las proteínas biotiniladas eran visibles fuera del endotelio vascular alrededor de una minoría de vasos (aproximadamente 5 %). En tumores de ratones a los que se había inyectado IgM de rata biotinilada de especificidad

irrelevante, la IgM biotinilada también se filtró en el intersticio tumoral alrededor de un porcentaje similar (aproximadamente 5 %) de vasos, pero parecía principalmente que no estaba unida mediante el endotelio vascular. Presumiblemente, la detección de 9D2 y anexina V extravasados por la técnica de tinción doble, aunque no por la técnica de inmunohistoquímica indirecta, refleja una mayor sensibilidad de la técnica anterior y una mayor precisión con la que se comparan los dos patrones de tinción. Los tumores de control no inyectados no se tiñeron completamente con Cy3-estreptavidina, indicando que la fluorescencia roja corresponde a una proteína localizada.

Ejemplo VII

Translocación de la membrana fosfolipídica aniónica en un entorno tumoral

El descubrimiento de aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos como marcadores de superficie *in vivo* únicos para células endoteliales vasculares tumorales estimuló a los inventores a investigar también el efecto de un microentorno tumoral sobre la translocación y expresión de la membrana externa de dichas moléculas. El presente ejemplo muestra que la exposición de células endoteliales *in vitro* a determinadas condiciones que imitan las de un tumor duplica la expresión en superficie anteriormente observada de aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos en células intactas, viables.

15 A. Materiales y Métodos

1. Yodación de anexina V

La anexina V humana recombinante se purificó de *E. coli* transformada con el plásmido fosfolípido 1 aniónico ET12a (obtenido del Dr. J. Tait, Universidad de Washington, Seattle). La pureza de la proteína y la unión a PS se confirmaron en SDS-PAGE y en plástico revestido con PS, respectivamente. Se usaron anticuerpos policlonales de conejo anti-anexina V purificados por afinidad para detectar la anexina V unida a PS. La Anexina V se marcó con radiación con ^{125}I usando cloramina T, como describe Bocci (1964). La actividad específica de aproximadamente 1×10^6 cpm por μg de proteína, se mide mediante el ensayo de Bradford (1976).

2. Tratamiento de células endoteliales

Las células endoteliales se trataron con citocinas o con factores de crecimiento a las concentraciones indicadas en la Tabla 11. Todos los reactivos se diluyeron en medio que contenía suero al 10 % y se incubaron con las células a 37 °C durante 24 h.

Para estudiar el efecto de la hipoxia, las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se incubaron en una atmósfera normóxica humidificada (O_2 al 21 %, CO_2 al 5 %) durante 48 h antes de transferirse a una atmósfera hipóxica humidificada (O_2 al 1 %, CO_2 al 5 %, N_2 al 94 %) en una cámara hermética (Billups Rothernberg, Inc. Del Mar, Ca). Las células se incubaron en una cámara hipóxica durante 24 h a 37 °C y después volvieron a un entorno normóxico durante 4 h a 37 °C. Las células se compararon con un cultivo en paralelo de un pase idéntico, se sembraron el mismo día y se mantuvieron completamente en condiciones normóxicas. En algunos estudios, se añadieron IL-1 α (10 ng/ml) y TNF α (20 ng/ml) al medio antes de transferir a la cámara hipóxica.

Para examinar el efecto de un microentorno ácido, las células se expusieron al medio de crecimiento que carecía de bicarbonato, que se ajustó a diferentes pH (que variaban entre 7,3 y 6,2) con la cantidad necesaria de HCl. Las células se incubaron a 37 °C en ausencia de CO_2 . Se confirmó que los medios de cultivo mantenían el pH asignado durante el periodo de cultivo de 24 h. Estas condiciones experimentales no eran tóxicas a células endoteliales bovinas o de ratón y no tenían efecto sobre la morfología celular o viabilidad de la monocapa unida.

3. Detección de PS en células endoteliales cultivadas mediante anexina V marcada con ^{125}I

Después del tratamiento con los reactivos descritos anteriormente, las células tratadas y control se incubaron con 7,1 pmoles de anexina V marcada con ^{125}I (200 μl /pocillo) en el tampón de unión. Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente, las células se lavaron extensamente y se disolvieron en 0,5 M de NaOH. Todo el volumen de 0,5 ml se transfirió a tubos de plástico y se contó en un contador gamma. La unión no específica se determinó en presencia de EDTA 5 mM y se restó de valores experimentales. Los resultados se expresaron como pmoles netos de anexina V unida a células, se normalizó por 1×10^6 células.

La unión máxima de la anexina V se determinó en células simultáneamente tratadas con actinomicina D y TNF α (50 ng/ml de cada componente). Como se ha indicado anteriormente, estos agentes causan apoptosis y la exposición de PS en 90-100 % de células endoteliales (Lucas *et al.*, 1998). La unión basal de anexina V- ^{125}I con células no tratadas se determinó en presencia de medio con suero al 10 %. La cantidad de anexina V- ^{125}I que se unió a los cultivos no tratados se restó de la de los cultivos tratados. La exposición de PS se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: anexina V (pmoles) unida a célula en condiciones experimentales dividido entre la unión de anexina V máxima (pmoles) multiplicado por 100. Cada estudio se realizó por duplicado y se realizó al menos tres veces. Se calcularon valores medios. El ET de los valores medios de tres experimentos distintos era menor del 5 %.

4. Detección de PS en células endoteliales cultivadas y en células tumorales MDA-MB-435

Células HUVEC y células tumorales se cultivaron en portaobjetos de cámara de 8 pocillos a aproximadamente una confluencia del 70 %. Para inducir la exposición a PS, las células se trataron con H₂O₂ (200 μM) en medio asérico durante 1 h a 37 °C. Las células se lavaron con DPBS y se incubaron con 2 μg/ml de anticuerpo 3G4 diluido en medio asérico durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar suavemente con DPBS, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % (v/v) en PBS durante 15 min.

La tinción simultánea del citoesqueleto con faloidina marcada con Rojo Texas (Molecular Probes, Eugene, OR), las células se permeabilizaron con Triton-X100 al 0,1 % en PBS durante 5 min. La faloidina marcada con Rojo Texas (diluida a 1:50 en PBS que contenía BSA al 1 %) y el anticuerpo anti-ratón de cabra marcado con FITC (diluido a 1:200 en PBS que contenía BSA al 1 %) se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Los núcleos celulares se tiñeron por contraste con DAPI. La IgG₃ de ratón de especificidad irrelevante y el anticuerpo secundario solo se usaron como controles negativos en estos estudios. Cada estudio se realizó por duplicado y se repitió al menos dos veces.

En otros estudios, las células tratadas con H₂O₂ se desprendieron con tripsina al 0,25 %, se lavaron, se suspendieron en DMEM enfriado con hielo que contenía azida sódica al 0,05 % p/v y 3G4 2 μg/ml durante 1 h. Los sedimentos celulares se lavaron con PBS que contenía BSA al 1 % y se suspendieron en el mismo tampón que contenía anticuerpo anti-ratón de cabra marcado con FITC (diluido a 1:200) durante 30 min. Después de lavar tres veces, los sedimentos celulares se suspendieron en PBS que contenía BSA al 1 % y azida sódica al 0,05 % p/v. Para la discriminación entre vivo/muerto, se añadió yoduro de propidio antes de realizar el análisis FACS.

B. Resultados

1. Inducción por H₂O₂

Células endoteliales de bEnd.3 de ratón se sembraron a una densidad inicial de 50.000 células/pocillo. Veinticuatro horas después las células se incubaron con concentraciones en aumento de H₂O₂ (de 10 μM a 500 μM) durante 1 hora a 37 °C o se dejaron sin tratar. Al final de la incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS que contenía gelatina al 0,2 % y se fijaron con glutaraldehído al 0,25 %. Pocillos idénticos se tiñeron con IgM anti-PS o se tripsinizaron y evaluaron con respecto a la viabilidad mediante el ensayo de exclusión con Azul de Tripiano. Para la tinción anti-PS, después de bloquear con gelatina al 2 % durante 10 min, las células se incubaron con 2 μg/ml de anticuerpo anti-PS, seguido por detección con anti-IgM de ratón conjugado con HRP.

La exposición de células endoteliales a H₂O₂ a altas concentraciones causa la translocación de PS en ~90 % de las células. Sin embargo, esto está acompañado por el desprendimiento de las células del sustrato y el descenso de la viabilidad celular a aproximadamente 50-60 %. La asociación de la expresión de PS en la superficie con la disminución de la viabilidad celular no es entendible, ya que aún es interesante observar que ~90 % de la translocación de PS se observa con solo una disminución de 50-60 % en cuanto a la viabilidad celular.

El uso de concentraciones más bajas de H₂O₂ dio como resultado expresión de PS significativa sin ninguna reducción apreciable en la viabilidad celular. Por ejemplo, PS se detectó en la superficie celular de aproximadamente el 50 % de las células en todos los pocillos tratados con H₂O₂ usando H₂O₂ a concentraciones tan bajas como 20 μM. Es importante observar que, bajo estos valores de concentraciones 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 un contacto de célula a célula de 100 %, una retención de la forma celular adecuada y un citoesqueleto intacto.

La expresión en superficie de PS al 50 % inducida por bajos niveles de H₂O₂ se observó por tanto en poblaciones de células en las cuales la viabilidad celular era idéntica a las células de control, no tratadas (es decir, 95 %). La expresión de PS asociada con altas concentraciones de H₂O₂ estuvo acompañada por una lesión celular, y las células positivas a PS expuestas a altas concentraciones de H₂O₂ se desprendieron, flotando y alteraron sus citoesqueletos.

El mantenimiento de la viabilidad celular en la presencia de bajas concentraciones de H₂O₂ es coherente con los datos de otros laboratorios. Por ejemplo, Schorer *et al.* (1985) mostraron que las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tratadas con H₂O₂ 15 μM tuvieron un promedio de 90 a 95 % de viabilidad (indicado como de 5 % a 10 % de lesión), aunque estas se exponen a H₂O₂ 1500 μM eran solo de 0 %-50 % viables (de 50 a 100 % de lesión).

El uso de H₂O₂ para imitar el entorno tumoral *in vitro* es también apropiado ya que el entorno tumoral es rico en células inflamatorias tales como macrófagos, PMN y granulocitos que producen H₂O₂ y otras especies de oxígeno reactivas. Aunque nunca se han relacionado con marcadores vasculares tumorales estables, se sabe que las células inflamatorias median la lesión celular endotelial mediante mecanismos que implican las especies de oxígeno reactivas que requieren la presencia de H₂O₂ (Weiss *et al.*, 1981; Yamada *et al.*, 1981; Schorer *et al.* 1985). De hecho, estudios realizados han demostrado que la estimulación de PMN *in vitro* produce concentraciones de H₂O₂ suficientes para causar lesión celular endotelial subletal sin causar muerte celular (medida mediante ensayos de liberación de cromo) o desprendimiento celular; y que estas concentraciones de H₂O₂ están obtenibles localmente *in*

vivo (Schorer *et al.*, 1985).

Los datos de translocación *in vivo* actuales se correlacionan con los anteriores resultados que muestran que los anticuerpos anti-PS se localizan específicamente en células endoteliales vasculares tumorales *in vivo*, y no se unen a células en tejidos normales. El hallazgo de que concentraciones de H₂O₂ como *in vivo* inducen la translocación de PS en la superficie de células endoteliales sin alterar la integridad celular tiene importantes implicaciones además de validar los datos *in vivo* originales y las estrategias terapéuticas de los inventores.

Se sabe que las células endoteliales humanas, bovinas y murinas son negativas a PS en condiciones normales. Como previamente se ha documentado la expresión de PS casi siempre se ha asociado con daño celular y/o muerte celular. Este no es el caso de estos estudios, en los que se conserva la viabilidad normal. Esto demuestra que la translocación de PS en endotelio vascular tumoral está mediada por mecanismos bioquímicos no relacionados con el daño celular. Se considera que esto es la primera demostración de que la expresión en superficie de PS en células endoteliales morfológicamente intactas y la primera indicación de que la expresión de PS puede no estar vinculada a la ruta de la apoptosis. Volviendo a la operatividad de la presente invención, estas observaciones confirman de nuevo que la PS es un marcador sostenible, en lugar de transitorio, de vasos sanguíneos tumorales y un candidato adecuado para la intervención terapéutica.

2. Inducción por trombina

También se observó que la trombina aumentaba la expresión de PS, aunque no al mismo grado que H₂O₂. Estos datos son también una parte íntegra del modelo de inducción tumoral de la expresión de PS desarrollada por los presentes inventores: la expresión de superficie de PS inducida por trombina en tejidos normales también fomentaría la coagulación de la expresión de PS que coordina el ensamblaje de los complejos del inicio de coagulación.

Se sabe que el entorno tumoral es protrombótico, de tal manera que la vasculatura tumoral está predispuesta a la coagulación (Patente de Estados Unidos nº 5.877.289). Dado que la trombina es un producto de la cascada de coagulación, esta está presente en la vasculatura tumoral. De hecho, la presencia de trombina induce la expresión de VCAM, lo que contribuye a la posibilidad de que los inventores aprovechen el VCAM como un marcador direccionable de vasculatura tumoral (Patentes de Estados Unidos nº 5.855.866; 5.877.289). Los datos presentes que muestran que la trombina también induce una expresión de PS son por tanto relevantes para el direccionamiento de aminofosfolípidos con anticuerpos desnudos y conjugados terapéuticos y explican adicionalmente los efectos beneficiosos del Factor Tisular que contiene el coaguligando anti-VCAM (Ejemplo I).

3. Otros agentes de estrés oxidativo

Células de ratón bEnd.3 o bovinas ABAE *in vitro* se trataron durante 24 h con diversas concentraciones de factores y condiciones que están presentes en el microentorno de muchos tumores (Lichtenbeld *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1996), tales como hipoxia/reoxigenación, trombina, acidez, citocinas inflamatorias y peróxido de hidrógeno (Tabla 11).

La externalización de PS y fosfolípidos aniónicos se cuantificó midiendo la unión de anexina V a ¹²⁵I. La cantidad de anexina V unida se comparó con la de las células en la cual la apoptosis del 90-100 % de las células se ha inducido mediante tratamiento combinado con actinomicina D y TNF- α . La actinomicina D y el TNF- α inducen la unión de 6,2 pmoles de anexina V por 10⁶ células (3,8 x 10⁶ moléculas de anexina V por célula) en ambos tipos de células, en buen acuerdo con los informes de la bibliografía (Rao *et al.*, 1992). Este valor se tomó como nivel máximo de fosfolípidos aniónicos externalizados.

40

TABLA 11

Inducción de PS recreando entorno tumoral

Tratamiento	Concentración	¹²⁵ I-Anexina V (% de unión máx.)	
		Células ABAE	Células bEnd.3
Medio con suero al 10 %	N/D	0	0
Actinomicina D + TNF α	50 ng/ml cada uno	100	100
VEGF	20 ng/ml	0	0
FGF-2	20 ng/ml	0	0
Factor de dispersión	40 ng/ml	0	0
TGF β_1	20 ng/ml	0	0
PDGF-BB	20 ng/ml	0	0
IL-10	20 ng/ml	0	0

Tratamiento	Concentración	¹²⁵ I-Anexina V (% de unión máx.)	
		Células ABAE	Células bEnd.3
IL-8	20 ng/ml	0	0
IL-6	20 ng/ml	0	0
IL-1 α	10 ng/ml	6,4	7,5
IL-1 β	10 ng/ml	5,8	5,5
Interferón	40 ng/ml	8,6	2,8
TNF α	20 ng/ml	7,4	13,7
Trombina	50 nM	8,8	17,4
Hipoxia	O ₂ al 1 %	15,0 a 17,5	22,5
Hipoxia + IL-1 α	Igual que el anterior	26,0	31,0
Hipoxia + TNF α	Igual que el anterior	33,0	36,0
pH 6,6	N/D	20,2	18,9
Peróxido de hidrógeno	200 μ M	95,5	98,4

En la Tabla 11, las concentraciones de las citocinas, factores de crecimiento y trombina usados se seleccionaron de los valores de la bibliografía para tener un efecto estimulador máximo en células endoteliales cultivadas. Estas concentraciones no causaron toxicidad durante el periodo del ensayo (24 h) juzgado por el aspecto morfológico, una ausencia de desprendimiento y una ausencia de captación de azul tripano. La concentración de H₂O₂ empleada fue la concentración máxima que no causó citotoxicidad en las condiciones seleccionadas.

La unión basal de ¹²⁵I-anexina V se determinó en presencia de medio de crecimiento solo. La exposición máxima de PS se determinó después de la inducción de la apoptosis mediante tratamiento combinado con actinomicina D y TNF α . Se presenta el promedio de duplicados de tres estudios separados. El error típico es menor del 5 %.

Las células no tratadas estaban ampliamente desprovistas de PS externalizada, según se juzga por anexina V o unión de anticuerpo anti-PS (9D2) (Tabla 11). La unión basal en presencia de medio de crecimiento de cultivo solo fue de 0,44 y 0,68 pmoles de ¹²⁵I-anexina V para células ABAE y células bEnd.3, respectivamente. Esto se corresponde con aproximadamente 7,1 % y 10,9 % de la unión máxima para células ABAE y bEnd.3, respectivamente, que se correlaciona bien con el hallazgo de que aproximadamente el 10 % de las células se unían a anexina V biotinilada en las mismas condiciones.

VEGF, HGF, FGF, TGF β ₁, PDGF, IL-6, IL-8 e IL-10 no aumentaron la unión de ¹²⁵I-anexina V por encima del nivel basal para células no tratadas (Tabla 11), ni tampoco lo hizo GM-CSF. Los mediadores inflamatorios (IL-1 α , IL-1 β , TNF α e interferón) causaron un pequeño aumento aunque reproducible en la translocación de PS y fosfolípidos aniónicos ya que varía de 5 a 8 % del nivel máximo para células ABAE y de 3 a 14 % para las células bEnd3.

La hipoxia/reoxigenación, trombina o condiciones externas ácidas (pH 6,8-6,6) indujo una externalización moderadamente alta de PS y de fosfolípido aniónico que varió de 8 a 20 % del nivel máximo de células ABAE y de 17 a 22 % del nivel máximo para células bEnd.3. El mayor aumento en la translocación de PS y fosfolípidos aniónicos se observó después del tratamiento con 100 a 200 μ M de peróxido de hidrógeno. Este tratamiento causó la externalización casi completa (95 %) de PS en ambos tipos de células considerado por la unión de ¹²⁵I-anexina V (Tabla 11). Más del 70 % de las células ABAE y bEnd.3 unidas a anexina V biotinilada, como se considera inmunohistoquímicamente.

Las células endoteliales en las que la translocación de PS y de fosfolípido aniónico se generó por tratamiento con hipoxia/reoxigenación, trombina, acidez, TNF α , IL-1 o H₂O₂ permanecieron unidas a la matriz durante un periodo del tiempo del ensayo (24 h), se mantuvo el contacto de célula a célula y se mantuvo su capacidad para excluir el colorante azul de tripano. La orientación de PS y fosfolípido aniónico normal se reestableció 24 a 48 h después en la mayoría de las células después de retirar el factor de inducción o de que las condiciones de cultivo volviesen a las normales. Estos resultados indican que un estrés oxidativo leve, creado por una aplicación directa de H₂O₂ o indirectamente mediante hipoxia/reoxigenación, acidez, trombina o citocinas inflamatorias, desencadena una translocación transitoria de PS y fosfolípidos aniónicos sobre células endoteliales viables.

4. Efectos combinados de citocinas inflamatorias e hipoxia/reoxigenación

Se observó exposición potenciada de PS y fosfolípidos aniónicos cuando se sometieron células ABAE y bEnd.3 a hipoxia/reoxigenación en presencia de IL-1 α o TNF α . En ausencia de las citocinas, la hipoxia/reoxigenación

aumentó la exposición de PS por células ABAE a 15 %-17,5 % del nivel máximo para células tratadas con concentraciones apoptóticas de antinomicina D y $\text{TNF}\alpha$. En presencia de concentraciones sub-tóxicas de $\text{IL-1}\alpha$ o $\text{TNF}\alpha$, la hipoxia/reoxigenación aumentó la exposición de fosfolípidos aniónicos a 26 % y 33 % respectivamente del máximo (Tabla 11). La comparación con el efecto de citocinas en ausencia de hipoxia/reoxigenación indica que la combinación de citocinas e hipoxia/reoxigenación tiene un mayor efecto aditivo sobre la exposición de PS. En las células bEnd.3 se observaron efectos similares.

Por lo tanto, en el entorno tumoral, la exposición de PS y de fosfolípidos aniónicos inducidos por hipoxia/reoxigenación puede amplificarse mediante citocinas inflamatorias y posiblemente mediante dichos otros estímulos tales como acidez y trombina. Los neutrófilos pueden desempeñar una función en este proceso.

Estos estudios *in vitro* arrojan luz sobre el mecanismo de la exposición de PS sobre células endoteliales tumorales *in vivo*. Demuestran que diversos factores inducen la exposición de PS en células endoteliales sin causar citotoxicidad, lo que imita la situación en tumores *in vivo*. La hipoxia seguida de reoxigenación, acidez y trombina aumentó más la exposición de PS en células endoteliales viables. Las citocinas inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\alpha$) también causaron una inducción débil aunque definida de la exposición de PS.

Estas condiciones posiblemente son los estímulos más inductores en tumores *in vivo* porque: i) el endotelio PS positivo prevalece en y en regiones circundantes de necrosis donde la hipoxia, acidez, vasos sanguíneos trombosados, e infiltración de leucocitos hospedadores se observan habitualmente; ii) el hallazgo de que hipoxia/reoxigenación amplifica la actividad de exposición a PS débil de $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 en células endoteliales *in vitro* se correlaciona con la situación *in vivo* en tumores en los que la hipoxia y tumores que secretan citocinas y células hospedadoras existen conjuntamente; iii) se ha descrito que la hipoxia/reoxigenación y la trombina generan especies de oxígeno reactivas (ROS) en células endoteliales a través de la activación de la enzima de membrana similar a la NADPH oxidasa (Zulueta *et al.*, 1995). ROS producido por células malignas podría contribuir a lesión celular endotelial (Shaughnessy *et al.*, 1989). El peróxido de hidrógeno era el inductor más poderoso de exposición de PS en células endoteliales cultivadas encontradas en el presente estudio, proporcionando una confirmación indirecta de la implicación de ROS.

Las PS externalizadas proporcionan una superficie fosfolípida negativa sobre la cual los factores de coagulación se concentran y ensamblan. Esto puede contribuir al estado procoagulante sobre el endotelio tumoral que se ha reconocido hace tiempo. PS también proporciona un sitio de unión para los macrófagos en circulación (McEvoy *et al.*, 1986), linfocitos T (Qu *et al.*, 1996) y células polimorfonucleares que ayudan a que se produzca la infiltración de leucocitos en tumores. La adherencia de macrófagos activados, células polimorfonucleares y plaquetas contra PS en el endotelio tumoral puede conducir a una secreción adicional de especies de oxígeno reactivas y posterior amplificación de exposición a PS.

5. Unión de anticuerpos a células HUVEC y MDA-MB-435 tratadas con H_2O_2

La unión del anticuerpo 3G4 a células HUVEC y MDA-MB-435 tratadas y no tratadas con H_2O_2 se analizó mediante citometría de flujo (FIG. 5A). Las condiciones de tratamiento con H_2O_2 se establecieron como se ha indicado anteriormente para inducir exposición de fosfolípidos aniónicos en la superficie externa de la membrana plasmática.

Ninguno de los tipos de célula se unió a niveles detectables de 3G4 antes del tratamiento con H_2O_2 . Después del tratamiento con H_2O_2 , la intensidad de fluorescencia media de las células teñidas con 3G4 seguido por anti-IgG de ratón conjugado con FITC era de aproximadamente 10 veces mayor que la de las células tratadas con BBG3 seguido por el reactivo secundario. Las células tratadas con H_2O_2 no se tiñeron con yoduro de propidio, lo que indicaba que sus membranas externas estaban intactas. La unión de 3G4 se bloqueó por liposomas preparados a partir de fosfolípidos aniónicos, pero no por liposomas preparados a partir de fosfolípidos neutros, indicando que 3G4 se unía a fosfolípidos aniónicos celulares.

Para determinar la distribución del anticuerpo 3G4 sobre la superficie celular, las células HUVEC y MDA-MB-435 tratadas con H_2O_2 se tiñeron con 3G4 mediante inmunofluorescencia indirecta y se examinaron usando microscopio de fluorescencia (FIG. 5B, FIG. 5C, FIG. 5D y FIG. 5E). El anticuerpo 3G4 tiñó regiones distintas de la membrana plasmática de células HUVEC y MDA-MB-435 tratadas con H_2O_2 . Las regiones teñidas de la membrana celular tuvieron el aspecto de ampollas de pequeña superficie (FIG. 5C, FIG. 5E) similares a las "ampollas de membrana" observadas sobre las células endoteliales tratadas con H_2O_2 (Hastie *et al.*, 1997; van Gorp *et al.*, 2002). Las células tratadas con H_2O_2 no se tiñeron con el anticuerpo de control, BBG3 (FIG. 5B, FIG. 5D), lo que mostraba que la unión de 3G4 a las células era específica de antígeno. Se observaron patrones de tinción idénticos con anexina A5 marcada con FITC. Las células tratadas con H_2O_2 positivas a 3G4 no mostraron signos morfológicos de condensación nuclear cuando se examinaban 1 h después de la adición de H_2O_2 , lo que coincidía con los informes de que la formación de ampollas en la membrana inducida por peróxido en células endoteliales estaba relacionada con la oxidación del glutatión, no con la apoptosis, y que puede ser reversible (van Gorp *et al.*, 2000).

Estos hallazgos por lo tanto indican que el anticuerpo 3G4 se une a fosfolípidos aniónicos que están normalmente ausentes de la superficie de células HUVEC o MDA-MB-435, y que se exponen a la superficie celular cuando las células se tratan con H_2O_2 .

EJEMPLO VIII**Efectos antitumorales de conjugados de anexina**

El hallazgo sorprendente de que los aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos eran marcadores estables de vasculatura tumoral significa que pueden usarse construcciones de agentes terapéuticos-anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Además de usar anticuerpos como agentes de direccionamiento, las anexinas, y otras proteínas de unión específicas, también pueden usarse para administrar específicamente agentes terapéuticos a la vasculatura tumoral. Los siguientes datos muestran los efectos antitumorales que resultan de la administración *in vivo* de las construcciones de anexina-TF.

A. Métodos

Se prepararon conjugados de anexina V-tTF y se administró a ratones nu/nu con tumores sólidos. Los tumores se formaron de células de carcinoma colorrectal HT29 humano que formaron tumores de al menos aproximadamente 1,2 cm³. El conjugado anexina V-tTF (10 µg) se administró por vía intravenosa y se dejó circular durante 24 horas. Los ratones tratados con solución salina se mantuvieron por separado como animales de control. Después de un periodo de tratamiento de un día, los ratones se sacrificaron y se exsanguinaron y los tumores y los órganos principales se recogieron para su análisis.

B. Resultados

Se descubrió que el conjugado de anexina V-tTF inducía la coagulación de vasos sanguíneos tumorales específicos en ratones portadores de tumor HT29. Aproximadamente 55 % de los vasos sanguíneos tumorales en animales tratados con conjugado anexina V-tTF se trombosaron después de una sola inyección. Por otro lado, hubo una prueba mínima de trombosis en la vasculatura tumoral de los animales de control.

EJEMPLO IX**Efectos antitumorales de anticuerpos 3SB anti-PS**

El presente ejemplo muestra los efectos antitumorales de anticuerpos anti-PS usando modelos de tumor singénicos y xenogénicos. El anticuerpo 3SB usado en este estudio se une a PS (y a PA) pero está esencialmente desprovisto de reactividad con PE. Este anticuerpo anti-PS causó lesión vascular tumoral, acompañada por trombosis y necrosis tumoral.

Los efectos de los anticuerpos anti-PS se examinaron primero en modelos de tumor singénico y xenogénico usando el anticuerpo 3SB. Para el modelo singénico, se inyectaron 1x10⁷ células de carcinoma colorrectal murino Colo 26 (obtenido del Dr. Ian Hart, ICRF, Londres) por vía subcutánea en el costado derecho de ratones BALB/c. En el modelo xenogénico, un xenoinjerto L540 de linfoma Hodgkin humano se estableció inyectando 1x10⁷ células por vía subcutánea en el costado derecho de ratones SCID CB17 macho. Los tumores se dejaron crecer a un tamaño de aproximadamente 0,6-0,9 cm³ antes del tratamiento.

Los ratones portadores de tumor (4 animales por grupo) recibieron una inyección i.p. de 20 µg de anticuerpo anti-PS 3SB (IgM), IgM de ratón de control o solución salina. El tratamiento se repitió tres veces con un intervalo de 48 horas. Los animales se monitorizaron diariamente con respecto a las mediciones tumorales y el peso corporal. El volumen tumoral se calculó como se describe en el Ejemplo I. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores habían alcanzado 2 cm³, o antes si los tumores mostraban signos de necrosis o ulceración.

El crecimiento de tumores tanto singénicos como xenogénicos se midió eficazmente por el tratamiento con anticuerpos anti-PS 3SB. Los anticuerpos anti-PS causaron lesión vascular tumoral, acompañada por trombosis y necrosis tumoral. La presencia de coágulos y disgregación de la masa tumoral que rodea las bases sanguíneas bloqueadas era evidente.

Cuantitativamente, el tratamiento con el anticuerpo anti-PS 3SB inhibió el crecimiento tumoral hasta el 60 % del volumen tumoral de control en ratones que portaban tumores grandes Colo 26 y L540. No se encontró retraso del crecimiento tumoral en ratones tratados con solución salina o IgM de control. No se observó toxicidad en ratones tratados con anticuerpos anti-PS, con órganos normales conservando una morfología inalterada, indistinguible de los ratones tratados con solución salina o los no tratados.

La regresión tumoral comenzó 24 horas después del primer tratamiento y los tumores continuaron disminuyendo de tamaño durante los siguientes 6 días. Esto se observó en modelos de tumor positivo inmunocomprometido y singénico indicando que el efecto estaba mediado por un mecanismo o mecanismos independientes del estado inmunitario. Además, la disminución de la carga tumoral estaba asociada con el aumento de alerta y aspecto en general sano de los animales, en comparación con los ratones de control portadores de tumores mayores de 1500 mm³. El recrecimiento tumoral se produjo 7-8 días después del primer tratamiento.

Los resultados obtenidos con tratamiento anti-PS de tumores L540 son atractivos adicionalmente por las siguientes

razones. Notablemente, la necrosis tumoral observada en el tratamiento del tumor L540 se produjo a pesar de el hecho de que el porcentaje de vasos que se tiñeron positivos para PS en tumores L540 era menor que en tumores HT29 y NCI-H358. Esto implica que incluso puede producirse una necrosis más rápida cuando se tratan otros tipos de tumores. Además, los tumores L540 generalmente se seleccionan como un modelo experimental porque proporcionan secciones histológicas limpias y son, en efecto, conocidos por ser resistentes a la necrosis.

EJEMPLO X

Efectos antitumorales del anticuerpo (9D2) contra fosfolípidos aniónicos

Este ejemplo demuestra los efectos del anticuerpo 9D2, que se une a PS y a otros fosfolípidos aniónicos, en estudios antitumorales *in vivo*.

- 10 Una dosis elevada (>150 µg) del anticuerpo de rata que se une a fosfolípidos aniónicos, 9D2, se inyectó en ratones desnudos que portaban tumores H358. Estudios de inmunolocalización muestran que este se localiza fuertemente en el endotelio tumoral (4+), aunque se observó alguna unión no específica, de nivel bajo, de 9D2 por vasos normales debido a la alta dosis (como podía observarse a partir de un anticuerpo IgM control de especificidad irrelevante).
- 15 Cuando 9D2 se inyectó i.p. en ratones SCID con un tumor L540 para la producción de líquido ascítico, el tumor se volvió necrótico y se colapsó. Después de la inyección de un anticuerpo de control (MK 2.7, IgG de rata) en un ratón SCID con un tumor L540, no se observaron efectos similares.

20 El efecto del anticuerpo anti-PS 9D2 sobre el crecimiento de tumores L540 *in vivo* se determinó después con más precisión. El tratamiento comenzó cuando los tumores alcanzaron 200-250 µl (día 0). Desde el día 0 al día 7, los ratones recibieron una inyección i.p. de ~150 µg de IgM (200 µl de sobrenadante) o 200 µl de DMEM al 10 %. Desde el día 7 al día 22, los ratones recibieron una inyección i.p. de ~300 µg de IgM (400 µl de sobrenadante) o 400 µl de DMEM al 10 %. El día 22 fue el último día de tratamiento y los ratones se sacrificaron.

25 Como se muestra en la Tabla 12, de los días 10 a 22, el crecimiento tumoral se inhibió generalmente en aproximadamente 40 % a 50 %. Al final del estudio, únicamente 4 ratones en el grupo tratado tenían tumores mayores de 2000 µl de volumen a diferencia de 9/9 en el grupo de control.

TABLA 12

Efectos de anticuerpos anti-PS sobre tumores L540 *in vivo*

Día después del inicio del tratamiento	Volumen tumoral promedio (µl)		% de Inhibición	Número de ratones con volumen tumoral > 2000 µl	
	Control	Tratado		Control	Tratado
0	341	320	6,2	0	0
1	464	325	10,8	0	0
3	412	415	0	0	0
7	687	455	33,8	0	0
10	904	544	39,9	1/9	0
13	945	545	42,4	1/9	0
15	1373	685	50,1	4/9	1/10
17	1426	842	41,0	4/9	4/10
20	1992	987	50,5	6/9	4/10
22	2560	1365	53,3	9/9	4/10

30 En otro estudio *in vivo*, los efectos del anticuerpo anti-PS de rata sobre el crecimiento de tumores L540 en ratones SCID CB17 se siguieron durante 45 días después de inyecciones de células tumorales. Estos ratones portadores de tumor se trataron con 300 µg de anticuerpo anti-PS diariamente, i.p. o con 300 µl de DMEM al 10 % diariamente, i.p. como control. Diversos parámetros del tratamiento tumoral eran notablemente mejores en el grupo tratado en comparación con los de los controles (Tabla 13).

TABLA 13

Efecto de los anticuerpos anti-PS sobre tumores L540 *in vivo*

Otros parámetros	Control	Tratados
% de tumores de regresión ¹ (60 días después del tratamiento)	0	40 %
% de tumores de regresión ¹ (90 días después del tratamiento)	0	20 %
Volumen promedio de tumores secundarios (μ l) ²	537 \pm 30	366 \pm 56

¹Tumores demasiado pequeños para medir en ratones tratados en los tiempos indicados (60 días frente a 90) después del tratamiento

5 ²Metástasis en ganglios linfáticos

En un estudio adicional, los anticuerpos 9D2 se inyectaron por vía intraperitoneal a una dosis de 100 μ g 3 veces a la semana a ratones con tumores L540. El tamaño tumoral se midió con calibradores dos veces a la semana. Los efectos antitumorales en comparación con el grupo de control eran notables.

EJEMPLO XI

10 **Efectos antitumorales del anticuerpo anti-PS 3G4**

El presente ejemplo demuestra efectos antitumorales adicionales usando el anticuerpo anti-PS 3G4 en modelos de tumor singénico y xenogénico. El anticuerpo 3G4 usado en este estudio es un anticuerpo IgG que se une a PS y a otros fosfolípidos aniónicos (Ejemplo IV).

A. Protocolos para estudios tumorales en animales

15 Los efectos de 3G4 se examinaron en modelos de tumor singénico y xenogénico. El protocolo general para los estudios de tratamiento tumoral en animales se realiza de la siguiente manera. A menos que se especifiquen diferencias particulares, este es el protocolo que se utiliza en todos los estudios de la presente solicitud.

20 Los animales se obtuvieron en Charles Rivers Laboratories. Los ratones tenían 4-5 semanas de vida, eran ratones hembras, C.B-17 SCID o Fox Chase SCID. Los ratones se alojaron en una jaula esterilizada en autoclave, con agua y alimento estériles, y manipulación estéril. Todos los procedimientos se realizaron en campanas de flujo laminar. Los ratones sea aclimataron 1 semana y después se etiquetaron en la oreja y se tomó una muestra de sangre (aproximadamente 75-100 μ l) de la vena de la cola para comprobar la filtración por ELISA. Todos los ratones que no aprobaron el ensayo ELISA de filtración no deberían usarse para procedimientos de ensayo. Los ratones recibieron una inyección ortotópica de células tumorales en los panículos adiposos mamarios (MFP) o por vía subcutánea en el costado derecho 2-3 días después del marcaje de la oreja y la extracción de la muestra de sangre.

25 En el modelo ortotópico, 1×10^7 células en DMEM 0,1 ml se inyectaron típicamente en MFP de ratones anestesiados. Los ratones se anestesiaron con 0,075 ml de cóctel de ratón inyectado IP. El cóctel de ratón es Ketamina 5 ml (100 mg/ml); Xilazina 2,5 ml (20 mg/ml); Acepromazina 1 ml (10 mg/ml); agua estéril 11 ml. La dosificación es de 0,1 ml por 20-30 gramos de peso corporal mediante la vía IP durante un tiempo de 30 minutos.

30 Una vez anestesiado el ratón, según se mide por una ausencia de respuesta en una punción en los dedos del pie/en el pie, el ratón se deja en su lado izquierdo y se le aplica etanol al 70 % justo por detrás de la cabeza y alrededor del área del antebrazo/parte dorsal derecha. Se realiza una incisión de 2-3 mm justo por detrás del brazo anterior derecho (tórax lateral), lo que revela una almohadilla de grasa blanquecina cuando se eleva la capa de piel. 0,1 ml de células se inyectan en la almohadilla de grasa usando una jeringa de 1 ml y una aguja de calibre 27, que produce una ampolla en la almohadilla de grasa. La incisión se cierra usando una grapa de herida estéril de 9 mm. El ratón se vuelve a dejar en su jaula y se observa hasta que se despierta de la anestesia y se mueve. El estado de salud pos-operatorio se determina y si se observa algún signo de malestar, el animal recibe acetaminofeno (0,24 mg/ml) + codeína (0,024 mg/ml) en el agua potable. La grapa de herida se retira después de 1 semana. Este método se usa de tal manera que las células se colocan exactamente en el sitio seleccionado y no en la región subcutánea. Los tumores serán de aproximadamente un volumen de 200 μ l (LxAxA) en 14-15 días y la tasa de captación es esencialmente de 100 %.

45 En el modelo subcutáneo, a los ratones se les inyecta típicamente 1×10^7 células en 0,2 ml. Los ratones no se anestesian, pero se sujetan usando un agarre firme de la piel de ratón exponiendo el costado derecho. Una jeringa de 1 ml con una aguja de calibre 23 se usa para inyectar 1×10^7 células en 200 μ l, justo debajo de la piel de los ratones y hasta que se observa una ampolla. No es inusual observar una pequeña cantidad de filtración de fluido del

sitio de inyección. Puede usarse un movimiento de rotación cuando se retira la aguja de la inyección subcutánea para reducir esta filtración. El volumen tumoral se mide mediante LxAxA.

En el protocolo de perfusión, a los ratones se les inyecta IV 1000 U de heparina en 0,2 ml de solución salina. Después los ratones se sedan inyectando al ratón IP 0,1 ml de cóctel de ratón. Una vez sedado el ratón lo suficiente, medido mediante ausencia de reflejo cuando se pellizca en el pie/dedo del pie, la cavidad torácica se abre para exponer el corazón y los pulmones. Una aguja de calibre 30 conectada con tubos y una bomba de perfusión se insertan en el ventrículo izquierdo. El ventrículo derecho se corta para que la sangre pueda salir por goteo. La solución salina se bombea durante 12 minutos a una velocidad de 1 ml por minuto. Al final de la perfusión, se retiran la aguja y el entubado. Los tejidos se extirpan para estudios posteriores, inmunohistoquímicamente o patológicamente.

B. Resultado del tratamiento del tumor

Para el modelo singénico, se usaron células tumorales de fibrosarcoma de ratón Meth A. En un modelo xenogénico, se sembraron células tumorales mamarias MDA-MB-231 humanas en el panículo adiposo mamario. En otro modelo xenogénico, un xenoinjerto L540 de linfoma de Hodgkin humano grande se estableció inyectando células y permitiendo que el tumor creciera al tamaño de más de 500 mm³ antes del tratamiento. Los ratones portadores de tumor (10 animales por grupo) recibieron una inyección i.p. de 100 µg de anticuerpo anti-PS 3G4 (IgG) a diferencia del control. El tratamiento se repitió 3 veces a la semana. Los animales se monitorizaron dos veces a la semana para realizar las mediciones tumorales.

El crecimiento de los tumores singénicos y xenogénicos se inhibió eficazmente por el tratamiento con anticuerpos anti-PS 3G4. Los anticuerpos causaron lesión vascular tumoral, trombosis localizada y necrosis tumoral.

El tratamiento de las células tumorales singénicas, Meth A fue particularmente exitoso, y el tratamiento de las células tumorales mamarias MDA-MB-231 humanas que crecían en el panículo adiposo mamario también produjeron regresiones tumorales. Incluso en ratones portadores de grandes tumores L540, que se sabe que son resistentes a necrosis, el tratamiento con el anticuerpo 3G4 inhibió el crecimiento tumoral en comparación con el control. No se observó retraso del crecimiento tumoral en los ratones de control. No se observó toxicidad en los ratones tratados con anticuerpos anti-PS.

Los tumores también se establecieron usando células MD-MBA-435s y se trataron como se describe anteriormente. El crecimiento de estos tumores también se inhibió de un modo eficaz mediante tratamiento con el anticuerpo 3G4. El tratamiento de tumores L540 grandes, células tumorales MDA-MB-231 y MD-MBA-435s durante 60 días también fue eficaz. Los anticuerpos causaron lesión vascular tumoral, trombosis y necrosis y crecimiento tumoral retrasado, sin evidencias de toxicidad.

Se obtuvieron células MD-MBA-435s luciferasa del Dr. Angels Sierra Jiménez, Barcelona, España y se cultivaron en DMEM al 10 %. Los ratones recibieron una inyección de células tumorales como se ha descrito anteriormente, y a las 2 semanas después de la inyección, los tumores se midieron y se registró el volumen. El tratamiento de ratones con tumores de volúmenes promedio similares (200 mm³) se realizó usando el anticuerpo 3G4 y el anticuerpo 3G4 quimérico, producido como se describe en el Ejemplo XIX, frente a control. El tratamiento se inició por inyección IP (800 µg) el día 15 y continuó con inyecciones de 200 µg cada dos a tres días hasta la inyección final de 400 µg el día 35. Los volúmenes tumorales y los pesos corporales de los ratones se midieron en los días de la inyección. Los ratones se sacrificaron y se perfundieron con solución salina durante 12 minutos. Los órganos y el tumor se extirparon, se ultra-congelaron en nitrógeno líquido y el tumor se seccionó para análisis inmunohistoquímico.

Este estudio muestra que tanto el anticuerpo 3G4 como el anticuerpo 3G4 quimérico retrasan de un modo eficaz el crecimiento tumoral a diferencia del control.

EJEMPLO XII

Efectos antivíricos de anticuerpos anti-PS frente a CMV

Sorprendentemente, cambiando de campo de la vasculatura tumoral a infecciones víricas, los inventores razonaron después que los anticuerpos contra aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos también podrían ejercer del mismo modo un efecto antivírico. El presente ejemplo de hecho muestra que esto es verdad, usando primero el anticuerpo 3G4 en el tratamiento de infección por citomegalovirus (CMV).

A. Métodos

1. Tratamiento de células infectadas por CMV *in vitro*

Monocapas confluentes de fibroblastos de prepucio diploide humano (HHF-R2) en placas de 6 pocillos se infectaron con CMV humano AD169 que expresa proteína fluorescente verde (GFP) a una MOI = 0,01 como se ha descrito anteriormente (Bresnahan *et al*, 1996). En resumen, las células se incubaron con virus en un volumen total de 1 ml por pocillo a 37 °C durante 90 minutos. Durante la infección, las placas se balancearon suavemente cada 30

minutos. Después de la infección, el sobrenadante celular se retiró y se añadió DMEM/FBS al 10 %/pen-strep (2 ml por pocillo) a cada pocillo.

5 Se añadieron diluciones de 3G4 o el anticuerpo de control del mismo isotipo GV39G (100 µg/ml y 50 µg/ml) a los pocillos. Las células infectadas se incubaron a 37 °C durante un total de 19 días. El medio y el anticuerpo en cada pocillo se reemplazaron cada 3 días. El día 19, las células y los sobrenadantes de cada pocillo se recogieron y se congelaron a -80 °C hasta realizar los ensayos con placa.

2. Microscopia fluorescente

10 El CMV recombinante expresa GFP bajo el control del promotor SV40. Por tanto, las células infectadas aparecen de color verde bajo el microscopio fluorescente. En estos estudios, las células infectadas con CMV tratadas con anticuerpo se observaron con un microscopio fluorescente en los días 2, 3 y 9.

3. Ensayos de placa

15 Los ensayos de placa se realizaron usando protocolos convencionales. En resumen, las suspensiones celulares de células congeladas se descongelaron rápidamente a 37 °C y se centrifugaron para retirar los residuos a 1000 rpm durante 1 minuto. Se añadieron diluciones diferentes de los sobrenadantes celulares a monocapas sub-confluentes de células HHF-R2 en placas de 6 pocillos y las células se incubaron a 37 °C durante 90 minutos (las placas se balancearon suavemente cada 30 minutos). Después de la infección, los sobrenadantes celulares se retiraron y se reemplazaron por 2 ml de DMEM/FBS al 10 %. El día 4, el sobrenadante de cada pocillo se retiró y las células se dispusieron con agarosa de bajo punto de fusión al 0,01 %/DMEM/FBS al 10 %. Las placas se incubaron a 37 °C durante total de 14 días después de la infección. El día 14, las monocapas infectadas se fijaron con formalina tamponada al 10 % y se tiñeron con azul metileno para visualizar las placas.

B. Resultados

1. 3G4 inhibe la dispersión vírica de CMV

25 Para investigar si el 3G4 tenía un efecto inhibitor sobre la infección y replicación del CMV, se trataron previamente fibroblastos humanos confluentes con 3G4 antes de añadirse CMV a una m.o.i. baja. El CMV usado en estos estudios expresa proteína fluorescente verde (GFP). Por tanto, las células infectadas aparecen de color verde cuando se observan bajo el microscopio fluorescente.

El día 3 del tratamiento, con 50 µg/ml y 100 µg/ml de anticuerpo, hay células individuales infectadas tanto en pocillos no tratados como en pocillos tratados con 3G4 o anticuerpo de control del mismo isotipo, GV39G. Por tanto, el tratamiento de los fibroblastos con 3G4 no parece inhibir de un modo significativo la entrada del virus en las células.

30 El día 9, sin embargo, hubo una drástica diferencia en la cantidad de células infectadas en pocillos tratados con 3G4 frente a pocillos tratados con GV39G control. Aunque el virus se había diseminado aproximadamente a 80 % de la monocapa en los pocillos de control, el virus está restringido a la célula infectada individualmente original en los pocillos tratados con 3G4. Por tanto, 3G4 limita la difusión de CMV de la célula infectada original a las células circundantes. Esta inhibición de la difusión vírica se observa cuando las células se tratan con 100 µg/ml y 50 µg/ml.

35 2. La inhibición vírica es dependiente de la concentración de anticuerpo

40 Para determinar qué concentración de 3G4 es necesaria para el efecto antivírico a una m.o.i. baja, se trataron células infectadas con diferentes concentraciones de 3G4 y el anticuerpo de control, GV39G. La inhibición completa de la dispersión de célula a célula se observó con 3G4 a 100 µg/ml y 50 µg/ml. Cuando las células se trataron con 25, 12,5 y 6,25 µg/ml de 3G4, hubo cantidades en aumento de células infectadas con CMV positivas a GFP. Aunque 3G4 no impide totalmente la dispersión vírica de las células infectadas primarias a estas concentraciones más bajas, aún tiene un efecto antivírico significativo, dado que se observan células infectadas con CMV positivas a GFP en los pocillos tratados con 3G4 en comparación con los pocillos de control tratados con GV39G.

3. Cuantificación de la carga vírica a una M.O.I. baja

45 El efecto antivírico de 3G4 se cuantificó realizando ensayos de placa para determinar la carga vírica después del tratamiento del anticuerpo. Los controles incluyeron células no tratadas, el anticuerpo GV39G y un control de anticuerpo adicional usando el anticuerpo C44, un anticuerpo isotipo IgG2a de ratón contra colchicina.

50 El tratamiento de células infectadas (m.o.i. = 0,01 ufp/célula) con 100 µg/ml de 3G4 dio como resultado una disminución drástica de 6 log₁₀ en la titulación vírica en comparación con el control, células tratadas con GV39G. Esta inhibición se traduce en aproximadamente una inhibición de 99,999 % de replicación vírica. A una concentración de 50 µg/ml, el tratamiento con 3G4 da como resultado una disminución de 3,5 log₁₀ en la titulación vírica en comparación con el tratamiento con GV39G. Usando 3G4 a 25 µg/ml y 12,5 µg/ml, los resultados son aún drásticos, e incluso a 6,25 µg/ml aún se observa un efecto inhibitor.

4. Cuantificación de la carga vírica a una multiplicidad de infección (m.o.i.) alta

El tratamiento con 3G4 de fibroblastos expresados a una m.o.i. alta de 3 también da como resultado una reducción drástica en la titulación vírica. A 100 µg/ml, el tratamiento con 3G4 produjo una disminución 5 log₁₀ en la titulación vírica en comparación con el control, células tratadas con GV39G. A 50 µg/ml, 3G4 inhibía la replicación vírica en 3 logs cuando se comparaba con GV39G.

5. Inhibición de la replicación en una fase tardía

Para determinar qué fase del ciclo replicativo del CMV está bloqueado por 3G4, se realizó un estudio de adición en función del tiempo. Para esto, se añadió 3G4 a fibroblastos infectados a una m.o.i. alta en momentos diferentes después de la infección. La carga vírica (tanto en las células como en el sobrenadante) se cuantificó usando un ensayo de placa convencional.

La adición de 3G4 hasta 24 horas después de la infección produjo una disminución de 5-6 log₁₀ en la titulación vírica. Sin embargo, cuando la adición de 3G4 se retrasó a 48 horas, el efecto inhibitorio de 3G4 se redujo a 2 log₁₀ y cuando la adición se retrasó de 72 a 96 horas, el efecto inhibitorio se redujo adicionalmente. Esto demuestra que 3G4 interfiere con una fase tardía de replicación del CMV que se produce entre las 24-48 horas después de la infección. Por tanto, 3G4 no interfiere significativamente con infección o con la expresión génica temprana o temprana inmediata. Sin embargo actúa tarde en el ciclo de replicación vírica, por ejemplo, en la expresión génica tardía, síntesis de ADN vírico, empaquetamiento o salida vírica.

EJEMPLO XIII

Efectos antivíricos de anticuerpos anti-PS frente a VSR

Además de los efectos antivíricos drásticos contra CMV mostrados en el Ejemplo XII, el presente ejemplo demuestra el uso de tres anticuerpos anti-PS diferentes en la inhibición de la Replicación del Virus Sincitial Respiratorio (VSR).

A. Métodos

1. Tratamiento de células infectadas por VSR *in vitro*

Células A-549 se cultivaron a una confluencia al 100 % en tres placas de cultivo de tejido de 12 pocillos Costar. A todos los pocillos se añadieron 200 µl de medio Eagle esencial mínimo. Se añadió anticuerpo (Ab) anti-fosfolípido (100 µg en 100 µl) a 9 pocillos de cada placa y 30 min después las células en 6 de estos 9 pocillos iniciales se infectaron con una MOI de 1 con cepa larga VSR en un volumen de 100 µl. Los tres pocillos restantes se dejaron como pocillos tratados con anticuerpo, no infectados. Los otros tres pocillos sin anticuerpo se infectaron con VSR a la misma MOI que la descrita anteriormente.

Cada placa se usó para ensayar los tres anticuerpos diferentes: 3G4, 3SB y 1B9 (Ejemplo IV). Las células se incubaron en CO₂ al 5 % a 40 °C durante 2 horas y después se añadieron 600 µl de medio para completar un volumen de 1 ml en cada pocillo. Una placa de células A549 se dejó en las mismas condiciones que las del control. Los sobrenadantes se recogieron a las 4, 24 y 72 horas después de la infección. En cada momento, se mostraron cuatro pocillos de cada placa: un pocillo solo con células tratadas con Ab, dos pocillos tuvieron células infectadas con VSR/tratadas con Ab y un pocillo tuvo solo células infectadas con VSR. Las muestras se congelaron a -80 hasta realizar el ensayo de placa.

2. Ensayos de placa

Los ensayos de placa se realizaron como se ha descrito anteriormente (Kisch *et al.*, 1963; Graham *et al.*, 1988). En resumen, las suspensiones celulares de las células congeladas se descongelaron rápidamente a 37 °C. Se prepararon tres diluciones de 10 veces a partir de los sobrenadantes de células no diluidos: 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³. Se inocularon 100 µl de cada dilución más la muestra diluida en placas de línea celular Hep-2 confluentes al 80 % todas por triplicado. Las placas se colocaron en CO₂ al 5 %, en una incubadora a 40 °C durante 5 días. El 5º día, las placas se desarrollaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina para revelar las placas en cada pocillo. Las placas se contaron usaron un microscopio de disección para calcular la carga vírica VSR en ufc (unidades formadoras de placas)/ml.

B. Resultados

El tratamiento de células infectadas con VSR con 3SB o 1B9 dio como resultado una disminución log en la replicación vírica. El efecto antivírico incluso fue más pronunciado cuando las células infectadas se trataron con 3G4. El tratamiento con 3G4 dio como resultado una disminución de 2 log₁₀ en la titulación vírica. La inhibición fue menor que la observada con CMV, más probablemente porque la concentración de 3G4 era baja (25-50 µg/ml).

EJEMPLO XIV**Anticuerpos anti-PS monocatenarios**

5 Dado los muchos usos de los anticuerpos anti-PS descritos en el presente documento, incluyendo como agentes antitumorales en solitario, como agentes de direccionamiento para la administración de agentes terapéuticos conectados a tumores y como agentes antivíricos, el presente agente describe técnicas adecuadas para la generación de anticuerpos anti-PS monocatenarios (scFV), es decir, en el que los dominios V_H y V_L están presentes en una sola cadena polipeptídica, generalmente unidos mediante un enlazador peptídico.

A. Preparación de la biblioteca de anticuerpos de fagos

10 La reserva secundaria de la biblioteca bacteriana (aproximadamente 1×10^{10} clones) se inoculó en 100 ml de 2xTY que contenía ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ y glucosa al 1 %. Se cultivó con agitación a 37 °C hasta que la DO a 600 nm era de 0,5.

Se añadió fago auxiliar M13KO7 a 10^{13} ufp y se incubó sin agitación en un baño con agua a 37 °C durante 30 min. Las células infectadas se centrifugaron a 3.500 g durante 10 min. El sedimento se resuspendió en 200 ml de 2xTY que contenía ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ y kanamicina 75 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó con agitación a 30 °C durante una noche.

15 El cultivo se centrifugó a 10.800 g durante 10 min. Se añadió 1/5 de volumen de PEG/NaCl al sobrenadante, se mezcló bien y se dejó durante 1 h a 4 °C. Después se centrifugó a 10.800 g durante 30 min. El sedimento se resuspendió en 40 ml de PBS y se añadieron 8 ml de PEG/NaCl. Se mezcló y se dejó durante 20 min a 4 °C. Después se centrifugó a 10.800 g durante 10 min y el sobrenadante se aspiró. El sedimento se resuspendió en 2 ml de suero humano al 10 % y se centrifugó a 11.600 g durante 10 min en una microcentrífuga para retirar la mayoría de los residuos bacterianos restantes.

20 Para preseleccionar, la biblioteca de anticuerpos en fagos en suero humano al 10 % se añadió al disco recubierto con PC y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente.

B. Selección de liposomas biotinizados

25 Se disolvieron 20 μmol de fosfatidilinositol y 20 μmol de fosfatidilserina biotinizada en 10 ml de hexano. Esta solución se secó en una capa fina sobre la superficie de un matraz usando un evaporador de rotación. Se añadieron 2 ml de PBS y el baño se sometió a ultrasonido a 4 °C durante 30 minutos.

30 Después se mezclaron 100 μl de scFv del fago y 100 μl de liposomas biotinizados en presencia de suero humano al 10 % y se giraron suavemente durante una hora a temperatura ambiente. Se realizó bloqueo con 100 μl de dynabeads M-280 de estreptavidina añadiendo 600 μl de caseína al 2,5%/BSA al 0,5 % durante 30 min a temperatura ambiente. Las perlas se separaron del tampón de bloqueo con un MPC-E durante 4-5 min (Magnetic Particle Concentrator de Dynal).

35 Las perlas se resuspendieron en 100 μl de PBS. Se añadieron 100 μl de Dynabeads de estreptavidina bloqueadas al fago unido al antígeno biotinizado y se giró suavemente durante 15 min a temperatura ambiente. La separación se realizó con un MPC-E durante 5 minutos y el sobrenadante se vertió. Se lavó cinco veces con 1 ml de PBS. Para cada lavado, las perlas se resuspendieron y se sedimentaron con un MPC-E.

Finalmente, el fago se eluyó de las perlas resuspendiendo en 300 μl de trietilamina 100 mM durante 30 min. Se añadieron 150 μl de Tris 1 M pH = 7,4 para la neutralización. Las perlas se separaron de nuevo con el MPC-E.

40 Se usaron 150 μl de sobrenadante del fago para infectar 10 ml de bacterias TG1 en fase logarítmica. El cultivo de 10 ml se agitó en presencia de ampicilina 20 $\mu\text{g/ml}$ a 37 °C durante una hora. Se añadió ampicilina a la concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ y se agitó durante otra hora. Se añadió fago auxiliar M13 10^{13} ufp a este cultivo, se transfirió a 100 ml de medio 2TY que contenía ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ y se agitó a 37 °C durante una hora. Se añadió kanamicina a la concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ y se agitó a 30 °C durante una noche.

El procedimiento de preparación de fagos se repitió y el procedimiento de selección se repitió otras 3 a 4 veces.

C. ELISA con anticuerpo monocatenario monoclonal

45 Colonias HB2151 individuales de las placas (después de 4 rondas de selección) se inocularon en 500 μl de 2xTY que contenía ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ y glucosa al 1 % en placas de 96 pocillos y se cultivaron con agitación (300 rpm) durante una noche a 37 °C. Se transfirieron 5 μl de esta placa a una segunda placa de 96 pocillos que contenía 500 μl de 2xTY que contenía ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ por pocillo y se cultivaron agitando a 37 °C durante 3 h (DO600=0,9).

50 A cada pocillo se añadieron 50 μl de 2xTY que contenía ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$, IPTG, 10 mM (la concentración final es 1 mM), que se cultivó con agitación durante una noche a 30 °C. Se centrifugó a 1800 g durante 10 minutos y se usaron 100 μl del sobrenadante en el siguiente ELISA.

Se recubrieron placas de 96 pocillos (DYNEX IMMULON®1B) con PS disuelto en etanol a una concentración de 10 µg/ml (el disolvente de P6641 10 mg/ml fue cloroformo: MeOH 95:5). Se recubrieron con PC 10 µg/ml de la misma manera. Estas placas se evaporaron a 4 °C en la cámara frigorífica. Se añadieron 250 µl de caseína 2,5 % a cada pocillo, y las placas se cubrieron y se bloquearon a 37 °C durante 1 hora.

5 Los pocillos se aclararon 3 veces con PBS, 100 µl/pocillo de suero humano 10 % y se añadieron 100 µl/pocillo de sobrenadante que contenía scFv soluble y se incubó durante 60 minutos a 37 °C. La solución se descartó y se lavó 6 veces con PBS. Se añadieron 100 µl de 9E10 en caseína 5 %/BSA-PBS 0,5 % (dilución 1:5000) a cada pocillo, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavaron 6 veces con PBS. Se añadieron 100 µl de anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP (dilución 1:10000) a cada pocillo, se incubaron a 37 °C durante una hora y se lavaron 5 veces con PBS. Se añadieron 100 µl de OPD 0,05 % a cada pocillo y se desarrollaron durante 5 minutos. Se añadieron 100 µl de H₂SO₄ 0,18 M para detener la reacción y se leyó a D.O. 490.

15 Se sembraron en estrías clones positivos para antígeno en placas 2xTYAG y se cultivaron durante una noche a 30 °C. Se seleccionaron colonias positivas individuales en 3 ml de medio 2xTYAG y se cultivaron durante 12 horas a 37 °C. Se extrajeron los plásmidos y se comprobaron los insertos génicos de scFv por digestión enzimática y PCR. Se secuenciaron los que tenían los insertos del tamaño correcto.

20 Las colonias con los insertos del tamaño correcto se cultivaron en 100 ml de medio 2xTYAG y se agitaron a 37 °C DO 600=0,5. Estas se transfirieron a 900 ml de 2xTYAG y se cultivaron hasta DO600=0,9. Se añadió IPTG 1 M hasta una concentración final de 1 mM y se agitó a 30 °C durante una noche. El sobrenadante se comprobó usando el mismo método de ELISA que antes. La proteína scFv se purificó de la fracción periplásmica usando cromatografía de afinidad de Ni⁺⁺-agarosa.

D. Resultados

Después de 4 rondas de selección, los siguientes clones dieron una señal ELISA prometedora en placas PS y tenían un inserto del tamaño correcto: 3E5, 3A2, G5, C8, E4 y 4D5. Estos se habían subclonado, en el que E4 dio 5 subclones positivos y 4D5 dio 5 subclones positivos (Tabla 14).

25 **TABLA 14**
ELISA en placa PS

0,099	0,107	0,118	0,115	0,100	0,094	0,084	0,086	0,166	0,164	0,102	0,191
0,113	0,106	0,127	0,150	0,128	0,097	0,078	0,087	0,190	0,144	0,102	0,154
0,122	0,115	0,117	0,112	0,105	0,097	0,085	0,088	0,230	0,071	0,168	0,150
0,107	0,108	0,121	0,123	0,107	0,101	0,083	0,085	0,191	0,246	0,186	0,150
0,138	0,121	0,114	0,131	0,100	0,096	0,082	0,079	0,183	0,187	0,275	0,171
0,118	0,115	0,116	0,132	0,099	0,094	0,082	0,086	0,185	0,073	0,208	0,102
0,111	0,176	0,126	0,118	0,096	0,087	0,123	0,087	0,144	0,226	0,112	0,126
0,102	0,107	0,131	0,125	0,089	0,102	0,082	0,084	0,188	0,073	0,142	0,151
3E5		3A2		G5		C8		E4		4D5	

30 Una vez identificados los clones positivos, estos se secuenciaron. La secuencia de ácido nucleico de ScFv y proteína del clon 3A2 se expone en la SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6, respectivamente. Los clones positivos se cultivaron a una gran escala y el scFv purificado usando cromatografía de afinidad en agarosa con níquel. El scFv purificado se había obtenido usando electroforesis en gel Phast.

EJEMPLO XV

Síntesis de derivados peptídicos de unión a PE

35 El presente ejemplo se refiere al diseño y a la síntesis de derivados y conjugados peptídicos de unión a PE ejemplares para su uso en el tratamiento de tumores y enfermedades víricas. Las estructuras de los derivados de duramicina ejemplares se producen a partir de la siguiente descripción.

A. DLB

40 Se añadieron 0.5 mg (0,25 µmol) de duramicina disueltos en 0,387 ml de NaHCO₃ 0,1 M en agua a 0,113 mg (0,25 µmol) de NHS-LC-Biotina (Sigma). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y después a 4 °C durante una noche. La muestra se cargó sobre una columna de sílice, se lavó con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %, se eluyó con TFA al 0,1 % y CH₃CN al 70 %. El eluyente se recogió y se concentró por centrifugación. La

producción total fue de 0,5 mg.

B. DIB

Se añadieron 0,5 mg (0,25 μmol) de duramicina disueltos en 0,286 ml de NaHCO_3 0,1 M en agua a 0,034 mg (0,25 μmoles) de clorhidrato de 2-iminotiolano (2-IT). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadieron 0,13 mg (0,26 μmol) de yodoacetil-LC-Biotina (Pierce) 0,13 mg y la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y a 4 °C durante una noche. La muestra se cargó sobre una columna de sílice, se lavó con TFA al 0,1 %, se eluyó con TFA al 0,1 % y CH_3CN al 70 %. El eluyente se recogió y se concentró por centrifugación. La producción total fue de 0,5 mg.

C. (DLB)₄NA

Se disolvieron 1,9 mg (0,94 μmol) de duramicina en 0,5 ml de NaHCO_3 0,1 M en agua. Para esto, se añadieron 0,4 mg (0,88 μmol) de NHS-LC-Biotina (Sigma) en 200 μl de dimetilformamida (DMF). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 4 h. Se añadieron 10 mg (0,17 μmol) de neutravidina (NA) en 1 ml a la mezcla de reacción que se incubó a temperatura ambiente durante 2 h y después a 4 °C durante una noche. Después la muestra de reacción se cargó sobre una columna G-25 (volumen de 50 ml) en tampón PBS. Las fracciones se recogieron y se analizaron por SDS PAGE (phast gel). Las fracciones que contenían proteína (7-16) se agruparon conjuntamente, se esterilizaron mediante filtración a través de un filtro de 0,22 μm y se determinó la concentración midiendo la absorción a 280 nm. La producción total fue de 5,1 mg.

Después la muestra se fraccionó mediante FPLC. Se recogieron tres picos que correspondían a lo siguiente: pico 1: [(DLB)₄NA]₃ (fracciones 17-23); pico 2: [(DLB)₄]₂ (fracciones 24-33) y pico 3: (DLB)₄NA (fracciones 35-48). Todas las muestras se esterilizaron mediante filtración a través de un filtro de 0,22 μm . Los rendimientos finales obtenidos fueron: 0,34 mg de [(DLB)₄NA]₃; 0,59 mg de [(DLB)₄]₂ y 1,41 mg de (DLB)₄NA.

D. (DLB)₄NA-F

Se añadieron 0,61 mg de (DLB)₄NA en tampón PBS a 0,005 mg de N-hidroxisuccinimidil fluoresceína (NHS-Fluoresceína) (Sigma) en DMF. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se fraccionó después en una columna PD10 (10 ml). Se eluyó (DLB)₄NA-F en las fracciones que contenían proteína (3 y 4), que se agruparon entre sí y se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 μm . La producción total fue 0,5 mg.

E. (DIM)_n HlgG

La IgG humana (HlgG) se purificó primero de la siguiente manera: se aplicaron 1,3 ml HlgG (que incluía HlgG 100 mg/ml, glicina 22,5 mg/ml y albúmina 3 mg/ml en tampón borato con EDTA 1 mM, pH 9) a una columna FPLC (S200, 250 ml). Las fracciones se recogieron y analizaron por SDS PAGE en un phast gel. Las fracciones que contenían IgG monomérico (21-32) se agruparon entre sí y se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 μm . La producción total como se determinó por absorción a 280 nm fue 111 mg.

La HlgG purificada (55 mg en 13 ml de tampón borato, pH 9) se añadió a 1,003 mg en 0,5 ml de SMCC (Pierce) en DMF. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Al mismo tiempo, otra mezcla de reacción que contenía 6 mg de duramicina (3 μmol ; disueltos en 0,5 ml de NaHCO_3 0,1 M) y 0,413 mg de 2-IT (3 μmol ; en NaCO_3 0,1 M) a temperatura ambiente durante 1 h. Después de finalizar las reacciones, las dos mezclas de reacción se combinaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h y a 4 °C durante una noche. Los productos de reacción se analizaron por SDS PAGE en un phast gel. Los productos de reacción se cargaron sobre una columna FPLC en tampón borato, pH 9. Las fracciones de FPLC correspondientes al trímero (5-14) dímero (15-24) y monómero (25-37) se agruparon y esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 μm . La producción total de monómero fue de 54,6 mg. Se unieron de cinco a siete grupos de duramicina a cada molécula de HlgG.

F. (DIM)_n HlgG-F

Se añadió 1 mg (0,7 ml) de (DIM)_nHlgG a 5 μl de NHS-Fluoresceína en DMF. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y se desalinizó en una columna PD-10.

Las fracciones que contenían proteína (2-3) se agruparon y esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 μm . La producción total fue de 0,9 mg.

G. (DIM)_n HlgG-B y [(DIM)_n HlgG]₂-B

Para sintetizar derivados biotinilados de [(DIM)_n HlgG]₂, se añadieron 0,66 mg (1 ml) de [(DIM)_n HlgG]₂ a 8 μl de NHS-LC-Biotina 1 mg/ml (Pierce) en DMF. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después la mezcla de reacción se desalinizó en una columna PD-10. Las fracciones que contenían proteína (3 y 4) se agruparon y se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 μm . La producción final fue de 0,46 mg.

La biotilación del monómero (DIM)_n HlgG se realizó de la misma manera. En resumen, se añadieron 1,06 mg (0,75 ml) de (DIM)_nHlgG a 12 µl de NHS-LC-Biotina 1 mg/ml en DMF. Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 h, el producto de reacción se desalinizó en una columna PD-10. Las fracciones que contenían proteína (3 y 4) se agruparon y se esterizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. La producción final fue de 0,62 mg.

5 H. (DIB)₄NA

Se disolvieron 2 mg (0,99 µmol) de duramicina en 0,5 ml de NaHCO₃ 0,1 M y se añadieron a 0,136 mg (0,99 µmol) de 2-IT. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de esto, se añadieron 0,483 mg (0,95 µmol) de yodoacetil-LC-Biotina (Pierce) y la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadieron 10 mg (0,17 µmol) de neutravidina en 1 ml de H₂O y se incubó a 4 °C durante una noche. La mezcla de reacción se fraccionó por FPLC. Se recogieron tres picos diferentes y se agruparon: [(DIB)₄NA]₃ (fracciones 17-23); [(DIB)₄NA]₂ (fracciones 24-33) y (DIB)₄NA (fracciones 35-48). Todas las muestras se esterizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Las producciones totales obtenidas fueron de 0,87 mg de [(DIB)₄NA]₃; 1,25 mg de [(DIB)₄NA]₂ y 1,83 mg de (DIB)₄NA.

I. (DIB)₄NA-B

15 Se añadieron 0,023 mg (0,3 µmol) de (DIB)₄NA a 0,9 µg de NHS-LC-Biotina (Pierce). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y después se desalinizó en una columna PD-10. La producción total fue de 0,04 mg.

J. DS-1

20 Se añadieron 5 mg (2,5 µmol) de duramicina disueltos en 0,5 ml de NaHCO₃ 0,1 M en agua a 0,319 mg (2,6 µmol) de 1,3 propano sultona. La mezcla se incubó a 4 °C durante una noche. La muestra se cargó en una columna de sílice, se lavó con TFA al 0,1 %, se eluyó con TFA al 0,1 % y CH₃CN al 70 %. El eluente se recogió y se concentró por centrifugación a presión reducida. La producción total fue de 5 mg.

K. DS-2

25 Se añadió 1 mg (0,497 µmol) de duramicina disuelto en 0,3 ml de NaHCO₃ 0,1 M en agua a 0,072 mg (0,523 µmol) de 2-IT. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadieron 0,125 mg (0,49 µmol) de Cloruro-SBF (Pierce). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y a 4 °C durante una noche. El péptido se purificó sobre una columna de sílice. El eluente se recogió y se concentró por centrifugación a presión reducida. La producción total fue de 1 mg.

L. DS-3

30 Se añadió 1 mg (0,497 µmol) de duramicina disuelto en 0,4 ml de NaHCO₃ 0,1 M en agua a 0,109 mg (0,592 µmol) del anhídrido cíclico de ácido 2-sulfobenzoico. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y a 4 °C durante una noche. El péptido se purificó en una columna de sílice. El eluente se recogió y se concentró por centrifugación a presión reducida. La producción total fue de 1 mg.

M. DS-4

35 Se añadieron 0,25 mg (0,124 µmol) de duramicina disueltos en 0,5 ml de NaHCO₃ 0,1 M en agua a 0,017 mg (0,124 µmol) de 2-IT. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después la mezcla se añadió a 0,049 mg (0,124 µmol) de reactivo de Ellman. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 h y durante una noche a 4 °C. Se añadieron 250 µl de una sal de hidrato monosódica de ácido 4-amino-5-hidroxi-2,7-naftaleno disulfónico 1 mg/ml a 100 µl de 2-IT 1 mg/ml. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadieron 50 µl de esta mezcla de reacción a la reacción previa y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. El péptido se purificó en una columna de sílice. El eluente se recogió y se concentró por centrifugación a presión reducida.

N. DS-5

45 Se añadieron 5 mg (2,5 µmol) de duramicina disueltos en 0,5 ml de NaHCO₃ 0,1 M en agua a 0,356 mg (2,6 µmol) de 1,3 butano sultona. La mezcla se incubó a 4 °C durante una noche. La muestra se cargó en una columna de sílice, se lavó con TFA al 0,1 %, se eluyó con TFA al 0,1 % y CH₃CN al 70 %. El eluente se recogió y se concentró por centrifugación a presión reducida. La producción total fue de 5 mg.

O. DC-1

50 Se añadieron 0,25 mg (0,124 µmol) de duramicina disueltos en 0,5 ml de NaHCO₃ 0,1 M en agua a 0,017 mg (0,124 µmol) de 2-IT. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después la mezcla se añadió a 0,049 mg (0,124 µmol) de reactivo de Ellman. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 h y durante

una noche a 4 °C. El péptido se purificó en una columna de sílice. El eluente se recogió y se concentró por centrifugación a presión reducida.

Ejemplo XVI

Los derivados de duramicina se unen específicamente a PE

5 El presente ejemplo muestra que los derivados de duramicina sintetizados en el ejemplo XV son específicos de PE y por lo tanto pueden usarse según su diseño, ligándose a agentes impermeables para células, de direccionamiento o antivíricos y usarse en el tratamiento de enfermedades tumorales y víricas.

10 Para ensayar la especificidad de los derivados de duramicina, particularmente la unión a PE en preferencia a otros fosfolípidos, se realizó una serie de ensayos ELISA de competencia. La capacidad de los derivados de duramicina para competir con cualquiera de DIB o DLB por la unión con PE se ensayó en el siguiente método.

15 Se disolvieron PE y PC por separado en etanol. La concentración final fue de 5 µg/ml. Se añadieron 100 µl a cada pocillo de placas ELISA de 96 pocillos (DYNEX IMMULON®1B). Estas placas se evaporaron a 4 °C en una cámara frigorífica. Se añadieron 250 µl de caseína al 2,5 % a cada pocillo, se cubrieron y se bloquearon a 37 °C durante 1 hora. El tampón de bloqueo se desechó y a cada pocillo se añadieron 100 µl de caseína al 2.5 %. El compuesto de duramicina se añadió como diluciones en serie a través de la placa, tal como (DIM)_nHlgG, (DIB)₄NA, (DLB)₄NA, DS, duramicina y DIB.

20 Las concentraciones de partida de (DIM)_nHlgG fueron de 1,4 mg/ml, la concentración de partida de (DIB)₄NA fue de 800 µg/ml y la concentración de partida de (DLB)₄NA fue de 800 µg/ml. Estas se incubaron a 37 °C durante 1 hora y se lavaron 5 veces con PBS. Se añadieron 100 µl de estreptavidina-HRP (dilución 1:5000) a cada pocillo, se incubaron a 37 °C durante 1 hora y se lavaron 5 veces con PBS. Se añadieron 100 µl de OPD al 0,05 % a cada pocillo y se desarrollaron durante 5 minutos. Se añadieron 100 µl de H₂SO₄ 0,18 M para detener la reacción y se leyó a una D.O. 490.

25 Los datos resultantes se tabularon y después se representaron gráficamente. Concentraciones en aumento de los derivados de duramicina disminuyen la absorbancia a 490 nm, mostrando que los derivados de duramicina compiten con DIB y DLB por la unión a fosfatidiletanolamina.

30 Los perfiles de unión de fosfolípidos de las construcciones de duramicina se confirmaron usando ensayos ELISA posteriores. Los lípidos de ensayo respectivos PS, PE, PI, CL, PC, PG, SM, y colesterol se disolvieron por separado en etanol y se usaron para recubrir placas ELISA. Los compuestos de duramicina se añadieron como diluciones en serie a través de las placas. Después de las etapas de incubación y de lavado, se añadió un reactivo secundario de detección a cada pocillo y se determinó la reactividad usando el ensayo colorimétrico descrito anteriormente.

35 Los perfiles de unión de fosfolípidos representativos para los derivados de biotina duramicina, DIB y DLB se representaron gráficamente. Se observó que DIB y DLB eran específicos para PE, siendo la unión a cada uno de PS, PI, CL, PC, PG y SM insignificante o no detectable. (DIM)_nHlgG-B y [(DIM)_nHlgG]₂-B tuvieron esencialmente los mismos perfiles de unión que DLB. Aunque se observó unión mínima a PS a altas concentraciones de DIB, esto no era significativo en el contexto de este estudio, ya que la unión a PS no era detectable a concentraciones de DIB que fueron saturantes y la concentración semimáxima para la unión de PE. Por lo tanto, las construcciones de duramicina se unen específicamente a fosfatidiletanolamina.

40 También se observó que el suero no tenía un efecto significativo sobre la unión a PE por los derivados de duramicina. Esto se ilustra a través de la unión del derivado de biotina duramicina DLB a placas ELISA recubiertas con PE en presencia y en ausencia de suero (BSA), en el que los perfiles de unión no muestran diferencias significativas.

Ejemplo XVII

Efectos antivíricos de los derivados peptídicos de unión a PE

45 Además de los efectos antivíricos mediados por anticuerpos anti PS, como se muestra en el Ejemplo XII y el Ejemplo XIII, el ejemplo presente demuestra que los efectos antivíricos de los derivados peptídicos que se unen específicamente a cualquier otro aminofosfolípido común, PE.

A. Métodos

1. Tratamiento de células infectadas con CMV *in vitro*

50 Se infectaron monocapas confluentes de fibroblastos de prepucio diploide humano (HHF-R2) en placas de 6 pocillos con CMV humano AD169 que expresaba proteína fluorescente verde (GFP) a una MOI = 0,01 como se describe en el Ejemplo XII (Bresnahan *et al*, 1996). Las células se incubaron con virus en un volumen total de 1,5 ml por pocillo a 37 °C durante 90 minutos. Durante la infección, las placas se balancearon suavemente cada 30 minutos. Después

de la infección, el sobrenadante celular se retiró y se añadió a cada pocillo DMEM/FBS al 10 %/pen-strep (2 ml por pocillo).

5 Se añadieron diferentes diluciones de derivados de duramicina (DLB)₄NA, (DIM)_nHlgG, DS-1, DS-2, DS-3 y DC-1 a los pocillos antes de la adición del virus, y después de la infección. Las células infectadas se incubaron a 37 °C durante un total de 14 días. El medio y el derivado de duramicina en cada pocillo se reemplazaron cada 3 días.

2. Microscopia fluorescente

10 Al igual que en el Ejemplo XII, el CMV recombinante expresa GFP bajo el control del promotor SV40. Por tanto, las células infectadas aparecen de color verde bajo un microscopio fluorescente. En estos estudios, las células infectadas con CMV tratadas con derivados de duramicina se observaron bajo un microscopio fluorescente los días 4 y 6.

B. Resultados

15 El día 4, hay células verdes positivas a GFP infectadas individualmente en pocillos no tratados y pocillos tratados con (DLB)₄NA y (DIM)_nHlgG. Por tanto, el tratamiento de células HHF-R2 con estos derivados de duramicina no parece inhibir la entrada de los virus en las células. Hay algunas pruebas preliminares de que los derivados de duramicina DS-1, DS-2 y DS-3 inhiben la entrada vírica en las células.

20 El día 6 después del tratamiento con (DLB)₄NA y (DIM)_nHlgG, hubo una notable diferencia en la cantidad de células positivas a GFP infectadas en los pocillos tratados con el derivado de duramicina frente a los no tratados. El día 6, el virus se distribuyó desde las células infectadas sencillas observadas en el día 4 a las células circundantes en los pocillos no tratados. Sin embargo, el día 6 en los pocillos tratados con (DLB)₄NA y (DIM)_nHlgG, el virus se limitó a las células infectadas individualmente originales.

Por consiguiente, (DLB)₄NA y (DIM)_nHlgG limitan la difusión de CMV desde las células infectadas originales a las células circundantes. Esta inhibición de la dispersión vírica se observa cuando las células se tratan con concentraciones diferentes de (DLB)₄NA (100 µg/ml y 50 µg/ml) y (DIM)_nHlgG (200 µg/ml y 100 µg/ml).

Ejemplo XVIII

25 Ventajas del anticuerpo 3G4

El anticuerpo 3G4 desarrollado por el protocolo exclusivo de los inventores, como se define en el Ejemplo IV, tiene muchas ventajas sobre los anticuerpos anti-PS en la bibliografía, incluyendo el anticuerpo anti-PS prominente, 3SB (Rote *et al.* (1993). El presente ejemplo describe determinadas de estas ventajas.

A. Clase y especificidad

30 3G4 es un anticuerpo IgG, mientras que 3SB es IgM. Los anticuerpos de la clase IgG tienen numerosas ventajas sobre los de la IgM, incluyendo su mayor afinidad, menor tasa de eliminación *in vivo* y simplicidad de purificación, modificación y manipulación. Una comparación de la unión de PS del anticuerpo IgM, 3SB, con el 3G4 y otro anticuerpo IgG se representó gráficamente.

35 3G4 reacciona fuertemente con los fosfolípidos aniónicos PS, PA, PI, PG y CL con aproximadamente la misma intensidad, y se une al aminofosfolípido PE menos fuertemente. No tiene reactividad con PC ni SM y tiene el perfil de especificidad de unión: PS=PA=PI=PG>CL>>PE (Ejemplo IV; Tabla 4). 3G4 no se une de manera detectable a heparina, heparán sulfato o a ADN mono o bicatenario, ni a proteínas celulares extraídas de células bEnd.3 o en trasferencias de Western. La unión de 3G4 no se ve afectada por la presencia de EDTA 5 mM, lo que muestra que no se requiere Ca²⁺ para la unión de 3G4 a fosfolípidos aniónicos. 3G4 no se unió a placas ELISA que se habían recubierto con fosfolípidos pero después de lavarse con Tween 20 al 0,2 % en solución salina, se confirma que la unión era sobre el fosfolípido absorbido.

40 El epítipo reconocido por 3G4 parece estar dentro del núcleo de fosfoglicerol de los fosfolípidos aniónicos, que es el mismo en los fosfolípidos de todas las especies de mamífero. Por tanto el anticuerpo reacciona con fosfolípidos tanto humanos como de ratón, lo que es importante para el desarrollo preclínico y clínico. 3G4 es más específico para fosfolípidos aniónicos que para el ligando natural, anexina V. A diferencia de 3G4, la anexina V también se une fuertemente a fosfolípidos neutros con concentraciones fisiológicas de Ca²⁺.

45 La especificidad de 3G4 por fosfolípidos aniónicos se confirmó mediante ensayos en los que los liposomas formados a partir de diferentes fosfolípidos se usaron para competir por la unión de 3G4 con PS inmovilizado. Los liposomas se prepararon a partir de soluciones de 5 mg de un fosfolípido sencillo en cloroformo. Las soluciones se secaron con nitrógeno para formar una fina capa en un matraz de vidrio de fondo redondo. Diez ml de tampón Tris (0,1 M, pH 7,4) se añadieron después y el matraz se sometió a ultrasonido cinco veces durante 2 minutos. El anticuerpo 3G4 (0,1 µg/ml) se añadió a tampón o a diferentes liposomas de fosfolípido y se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió a placas revestidas con PS (después de bloqueo convencional), se

50

incubaron durante 1 hora, se lavaron y se añadió el anticuerpo secundario. Después de 1 hora, las placas se lavaron y se desarrollaron durante 5 minutos usando OPD.

5 Como se muestra en el Ejemplo IV, 3G4 se une a PS, PA, PI, PG y CL cuando se inmoviliza y se une a PE inmovilizado en un menor grado, pero no se une a PC inmovilizada. La capacidad de 3G4 para unirse a PS inmovilizado en presencia o en ausencia de diferentes liposomas se muestra en la FIGURA 3. Los resultados de estos estudios de competición con liposomas muestran que la unión de 3G4 a PS adsorbido a placas ELISA se bloqueó por liposomas preparados a partir de PS, PA, PI y CL, pero que los liposomas preparados a partir de PE y PC no dieron como resultado una reducción detectable en la unión de 3G4 (FIG. 3). Además, los liposomas SM no eran inhibidores.

10 B. Inhibición de la proliferación celular

3G4 se une a células activadas, en división, lesionadas, apoptóticas y malignas que externalizan PS y otros fosfolípidos aniónicos. El anticuerpo 3G4 inhibe la proliferación de células endoteliales *in vitro* y muestra una inhibición selectiva notable de división de células endoteliales en oposición a células quiescentes.

15 Se determinó el efecto de los anticuerpos anti-PS 3G4, 9D2, 3B10, 1B9, 2G7, 7C5 y 3SB sobre el crecimiento de células bEnd.3 *in vitro*. Las células bEnd.3 (10.000/pocillo) se sembraron en placas de 48 pocillos y se permitió la unión. DMEM al 20 % en solitario (control) o DMEM al 20 % que contenía los anticuerpos (20 µg a 40 µg de IgG total por pocillo) se añadieron 4 horas después de la siembra. Cada clon se sometió a ensayo en dos placas individuales por triplicado. Las células se desprendieron 48 y 96 horas después, el recuento celular se determinó en cada pocillo y se calculó el promedio del número de células por tratamiento.

20 Los anticuerpos 3G4 y 9D2 eran particularmente eficaces, seguido por 3SB y 3B10, teniendo 1B9, 2G7 y 7C5 menores efectos inhibidores. Cada uno de los anticuerpos mostró una inhibición selectiva de división de células endoteliales (subconfluentes) en oposición a las células quiescentes (confluentes). En estudios comparativos, 3G4 mostró un mayor efecto inhibidor, seguido por 9D2, cada uno de los cuales eran más inhibidores que 3SB.

C. Efectos antitumorales

25 3G4 se une a la superficie de células endoteliales vasculares tumorales *in vivo*. Cuando se inyectan por vía intravenosa a ratones portadores de diversos tumores, 3G4 se localiza específica y uniformemente en el tumor, pero no en órganos normales. Se observó tinción en el endotelio vascular tumoral, áreas necróticas y en células malignas individuales. Hay múltiples sitios de unión para 3G4 en tumores, lo que permite el direccionamiento simultáneo de células tanto tumorales como endoteliales.

30 3G4 suprime la angiogénesis y el crecimiento tumoral *in vivo* y no muestra toxicidad de órganos detectable en ratones portadores de tumores. En estudios iniciales, 3G4 ha mostrado efectos antitumorales sorprendentes en modelos de tumor singénico o xenogénico en el que el anticuerpo causa lesión vascular tumoral, disminución de la vascularidad y necrosis tumoral (Ejemplo XI). Se han observado regresiones de tumores estabilizados en el 30 % al 50 % de los animales tratados.

35 Los efectos de direccionamiento vascular y antiangiogénico del anticuerpo 3G4 se han observado en estudios repetidos. Análisis de secciones tumorales de ratones desnudos portadores de tumores ortotópicos MDA-MB-231 tratados con 3G4 revelaron efectos antiangiogénicos en todos los tumores tratados en oposición a anticuerpos de control. El tumor de control no mostró signos de necrosis y está muy vascularizado, como se demuestra mediante el marcador celular panendotelial, CD31, detectado en vasos sanguíneos tumorales. Sin embargo, los tumores de los ratones tratados con 3G4 tuvieron una necrosis del 80 al 90 % y casi una desaparición completa de estructuras positivas a CD31, lo que indica que el tratamiento produce un efecto antiangiogénico sustancial.

45 Otro componente de la actividad anticancerosa de 3G4 es la inducción de lesión vascular tumoral. Esto se ilustra mediante vasos sanguíneos en los tumores de control que están bien perfundidos, morfológicamente intactos y rodeados por células tumorales en división viables, mientras que se observa frecuentemente que los vasos sanguíneos en los animales tratados con 3G4 tienen una capa endotelial disgregada y están bloqueados por células endoteliales desprendidas y, probablemente, por células hospedadoras que están unidas a los vasos desnudos. Los vasos en el tumor tratado con 3G4 claramente muestran una pérdida de función, lo cual se indica mediante una capa preneocrótica de células tumorales circundantes. Estos estudios también muestran que el tratamiento con 3G4 causa infiltración de leucocitos en tumores (FIG. 1).

50 En estos estudios, el tratamiento con 3G4 de ratones portadores de tumores MDA-MB-231 ortotópicos también disminuye el volumen plasmático y reduce la densidad vascular en los tumores. Se observó una reducción de 60 % de porcentaje en el volumen plasmático tumoral total de ratones tratados con 3G4 en comparación con los ratones tratados con BBG3, según la reducción en el marcador plasmático, FITC-dextrano. El número medio de vasos CD-31 positivos por milímetro cuadrado en tumores de ratones tratados con 3G4 fue de 50 ± 15 en comparación con 160 ± 20 en tumores de ratones tratados con BBG3, lo que representa una reducción en la vascularidad del tumor de aproximadamente 70 % después de tratamiento con 3G4.

En resumen, el examen histológico después del tratamiento de tumores MDA-MB-231 ortotópicos usando 3G4 muestra: 1) disgregación de endotelio vascular en aproximadamente 50 % de los vasos en el tumor; 2) fijación de leucocitos al endotelio tumoral e infiltración de células mononucleares en el intersticio tumoral; 3) oclusión de vasos tumorales mediante agregados plaquetarios y eritrocitos; 4) una reducción del 70 % en la densidad microvascular en tumores de ratones tratados con 3G4 frente a no tratados y 5) necrosis central de los tumores con supervivencia de un borde periférico de células tumorales, típico de un VTA. Por tanto, se ejerce una acción antitumoral primaria del anticuerpo 3G4 a través de efectos sobre la vasculatura tumoral. Otros mecanismos, particularmente citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo dirigido contra las propias celulares tumorales, posiblemente contribuyen al efecto antitumoral. Esto es importante y puede permitir la destrucción de más células tumorales, incluyendo las que se encuentran en el borde periférico.

En estudios de continuación, el efecto de 3G4 sobre el crecimiento tumoral se ha examinado en otros modelos murinos incluyendo xenoinjertos singénicos (fibrosarcoma Meth A de ratón), subcutáneos (linfoma Hodgkin humano L540) y tumores ortotópicos (cáncer de mama humano MDA-MB-231 y cáncer de mama humano MDA-MB-435). El tratamiento de ratones con el anticuerpo 3G4 dio como resultado un retraso del crecimiento de 90 %, 65 % y 50 % y 70 % de estos tumores, respectivamente. Los tumores tanto pequeños (diámetro de 0,1 cm) como bien establecidos (diámetro de 0,3 cm, 200 mm³) se inhibieron del mismo modo. El tratamiento anti-PS indujo remisiones completas prolongadas en el 50 % de los ratones portadores de Meth A y el 30 % de ratones con tumores MBA-MD-231. 3G4 tiene el efecto inhibitor más elevado en ratones inmunocompetentes. Los modelos ortotópicos de tumores de mama humanos (MDA-MB-231 y MDA-MB-435), en los que los tumores de mama humanos se desarrollan en el pániculo adiposo mamario de ratones son importantes ya que son modelos prácticos y realistas de cáncer mamario humano que se desarrolla dentro de la mama de seres humanos.

D. Perfil de seguridad

El anticuerpo 3G4 es diferente a los anticuerpos anti fosfolípido descritos en la bibliografía. Típicamente, los anticuerpos anti fosfolípido se consideran anticuerpos patógenos que interfieren con la cascada de coagulación. Inhiben las reacciones de coagulación *in vitro* y causan trombosis *in vivo*. Por otro lado, 3G4, 9D2 y anticuerpos similares son anticuerpos terapéuticos sin efectos patógenos.

1. Coagulación

Un aspecto importante de los anticuerpos 3G4, 9D2 y similares es el resultado de la capacidad de los inventores para preparar anticuerpos que no están ligados al síndrome antifosfolípido o a patologías asociadas.

En estudios de coagulación sanguínea *in vitro*, una leve inhibición de la coagulación inducida por el Factor Tisular (TF) se observó usando altas dosis de anticuerpo 3G4. En otros estudios usando dosis más bajas, plasma recalcificado de ratones tratados con 3G4 coaguló a la misma tasa que lo hizo el plasma recalcificado de ratones tratados con BBG3 en presencia de factor tisular. Además, la adición de 100 µg/ml de 3G4 a células más factor tisular *in vitro* no afectó a la tasa de generación del Factor Xa de coagulación en proplex (ruta de coagulación extrínseca).

A pesar de la débil inhibición de la coagulación inducida por TF usando altos niveles de anticuerpo *in vitro*, el anticuerpo 3G4 se había ensayado *in vivo* y no causa complicaciones trombóticas en ratones normales o portadores de tumor (por ejemplo, véase el Ejemplo XI). El anticuerpo 3G4 también se había ensayado en monos *in vivo* y no se han observado efectos secundarios significativos.

2. Otros indicadores de baja o ninguna toxicidad

La primera prueba de que 3G4 no tenía o tenía muy baja toxicidad en ratones procedía del hallazgo de que 3G4 se desarrolla como un hibridoma en ratones sin pruebas de toxicidad. Además, cuando se inyectaba 1 mg de 3G4 purificado por vía intraperitoneal, no se observaba toxicidad.

Estudios *in vivo* sistemáticos se han realizado ahora en los que grupos de tres ratones BALB/c de 8 semanas de vida recibieron una inyección IP de 100 µg de 3G4 purificado o con IgG₃ de control del mismo isotipo (BBG3) tres veces a la semana durante 2 a 4 semanas. No se observaron síntomas físicos de toxicidad ni síntomas histopatológicos de toxicidad en órganos o anomalías morfológicas se han detectado en secciones de órganos principales extirpados de ratones tratados con 3G4. Específicamente se examinaron los siguientes parámetros.

En términos de peso corporal, los ratones tratados con 3G4 aumentaron de peso a la misma tasa que los ratones tratados con BBG3. En estudios previos no se observó pérdida de peso. No hubo signos físicos de toxicidad, por ejemplo pérdida de pelo, pérdida de apetito, etc. y la actividad física fue normal en comparación con la de los animales de control.

No se identificaron pruebas de toxicidad hematológica en comparación con los animales control. La composición de la sangre periférica era normal (basándose en mediciones de recuentos de sangre completa con diferenciales); la evaluación de la morfología de eritrocitos no mostró pruebas de hemólisis intravascular (es decir, ausencia de esquistocitos); todos los parámetros de coagulación sanguínea (PT, APTT, dímero D) fueron normales. No hubo

cambios en los recuentos de las células sanguíneas, incluyendo eritrocitos, plaquetas, leucocitos, recuentos absolutos de linfocitos o recuentos absolutos de neutrófilos.

La celularidad y composición de la médula ósea eran normales. Para analizar la celularidad de la médula ósea, se examinaron secciones de parafina de médula ósea procedente de ratones tratados con 3G4 o BBG3 (seis inyecciones, 100 µg) para la composición celular y celularidad total. Las médulas en los animales tratados eran básicamente completamente celulares (como podría esperarse para un mamífero joven). Los progenitores eritroides, granulocíticos, linfocíticos y megacariocitos estaban presentes en cantidades normales. Otra toxicidad en órganos estaba ausente, como se evaluó mediante un examen histológico post mortem del pulmón, hígado, corazón, cerebro, intestino, estómago y riñón.

En resumen, no se observaron casos de toxicidad en más de 200 ratones tratados con altas dosis de 3G4 (0,1 mg) tres veces a la semana durante 2-4 semanas o en ratas. Incluso cuando se proporcionaban dosis tan altas como 2 mg, no se observaron signos de toxicidad. Los ratones conservaban síntomas físicos normales, celularidad de médula ósea, recuentos de leucocitos, histología y funciones de coagulación. En estudios posteriores, grupos de cinco ratones no portadores de tumores recibieron una sola inyección i.p. de 2 mg de 3G4, o inyecciones repetidas i.p. de 0,5 mg de 3G4 diariamente durante 14 días (dosis total 7 mg), no mostraron síntomas físicos de toxicidad.

También se realizaron estudios cinéticos de eliminación sanguínea en ratones. El 3G4 se marcó con radioyodo usando el reactivo de Bolton Hunter y recibieron una inyección intravenosa en los ratones (25 g). Las muestras de sangre se extrajeron a través de la vena de la cola en diversos momentos posteriores. La tasa de eliminación sanguínea de 3G4 era típicamente la de una IgG de ratón en el ratón. La semivida en la fase α de eliminación fue de 3 horas mientras que en la fase β fue de 5 días. El volumen de distribución fue normal (100 ml/kg). Estos estudios indican que 3G4 no interacciona con tejidos hospedadores normales, lo que conduce a su eliminación acelerada.

El anticuerpo 3G4 humanizado también se administró a conejos ateroscleróticos y mostró que era inocuo.

3. Estudios de seguridad en monos

El anticuerpo 3G4 humanizado (véase el Ejemplo XIX, más adelante) también se administró a monos en estudios de seguridad y no se observaron efectos secundarios significativos. El anticuerpo 3G4 humanizado se administró IV como un solo bolo hasta 100 mg/kg a monos cinomolgos. Esto es 100 veces la dosis terapéutica calculada (1 mg/kg).

El nivel de efecto no adverso (NOAEL) fue de aproximadamente 10 mg/kg/semana en dosificación repetida. Hubo una prolongación transitoria en APTT y PT a las dosis de 10-100 mg/kg. No hubo cambios significativos en los recuentos de células sanguíneas, incluyendo leucocitos, eritrocitos y plaquetas, u otros compuestos químicos clínicos.

E. Efectos antivíricos

El anticuerpo 3G4 también ejerce efectos antivíricos significativos. Como se muestra en el Ejemplo XIII, el tratamiento de células infectadas con VSR con 3G4 fue superior al efecto observado usando 3SB. Por lo tanto estos resultados destacan otra ventaja del anticuerpo 3G4 sobre el anticuerpo anti-PS prominente en la bibliografía, 3SB (Rote *et al.* (1993)).

También se observó que el anticuerpo 3G4 era muy eficaz inhibiendo el CMV, tanto *in vitro* (Ejemplo XII) como potenciando la supervivencia de ratones infectados con mCMV *in vivo* (Ejemplo XXI). Además, se demuestra adicionalmente que el anticuerpo 3G4 inhibe la infección por el virus Pichinde, el agente infeccioso de la fiebre Lassa (Ejemplo XXIV). La exposición de PS en la superficie celular en el presente documento que se ha mostrado que sigue la infección vírica y la capacidad del anticuerpo 3G4 para unirse a células infectadas con el virus Vaccinia (Ejemplo XXIII), muestra que el anticuerpo 3G4 tiene enorme potencial como un agente antivírico de amplio espectro.

Ejemplo XIX

Anticuerpo 3G4, secuencias CDR, construcciones quiméricas y relacionadas

El anticuerpo 3G4 por tanto posee las propiedades combinadas de un agente antiangiogénico, antitumoral vascular y antivírico. Las actividades inhibitoras de 3G4 sobre la división celular, angiogénesis, crecimiento tumoral, infectividad vírica, junto con la ausencia de toxicidad aparente, muestran indicaciones terapéuticas amplias para este anticuerpo, incluyendo en el tratamiento de trastornos angiogénicos, cáncer, diabetes e infecciones víricas.

Los anticuerpos que reconocen sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo 3G4 pueden generarse para su uso en una o más de las siguientes terapias antiangiogénicas, antitumorales vasculares y antivíricas, por ejemplo, por inmunización y confirmada por estudios de competición de anticuerpos. Los anticuerpos que se unen a esencialmente el mismo epítipo que el anticuerpo 3G4 también pueden generarse a partir de un conocimiento de las secuencias del anticuerpo 3G4 proporcionadas en el presente documento. Este ejemplo proporciona las secuencias

de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo 3G4 y el uso de la información de secuencias.

A. Secuencias del anticuerpo 3G4

5 Las secuencias originales de las regiones variables del anticuerpo se obtuvieron por RACE a partir del hibridoma que produce el anticuerpo 3G4 y las secuencias verificadas. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) de la CDR1-3 del anticuerpo 3G4 se representan por SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2, respectivamente.

10 La SEC ID N°: 1 y la SEC ID N°: 2 incluyen parte de la secuencia líder de ratón y las secuencias de la cadena constante, como se muestra en la FIG. 2A. La secuencia líder se representa por los aminoácidos 1 a 19 de la SEC ID N°: 2, y la proteína madura comienza como se muestra mediante la flecha en la FIG. 2A. Se incluye la información de secuencias de la región determinante de la complementariedad suficiente mediante la secuencia de la proteína madura hasta la parte de la secuencia que concluye en VSS, después de la cual los aminoácidos no son esenciales para la unión antigénica. Como tal, el sitio BstEII en la secuencia de ácido nucleico puede usarse como un sitio conveniente para preparar una región variable de ratón funcional, por ejemplo, para su uso en injerto en una región constante humana (FIG. 2A).

15 En la práctica, la secuencia 3G4-2BVH se ha injertado en una región constante γ 1 humana en el sitio BstEII usando un vector pEE de Lonza. El producto resultante contiene la secuencia líder de ratón y su VH está unida a la secuencia CH1 humana de la manera mostrada en la FIG. 2A, en la que ASTLGPSVFPLAPSSKSTSG (SEC ID N°: 7) representa la primera parte de la secuencia CH1 humana.

20 Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de la CDR1-3 del anticuerpo 3G4 se representa por la SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 4, respectivamente. De nuevo la SEC ID N°: 3 y la SEC ID N°: 4 incluyen parte de la secuencia líder de ratón y las secuencias de cadena constante, como se muestra en la FIG. 2B. La secuencia líder es de los aminoácidos 1 a 22 de la SEC ID N°: 4 y la proteína madura comienza como se muestra por la flecha en la FIG. 2B. Se incluye información de secuencia de la región determinante de complementariedad suficiente por la secuencia de la proteína madura hasta la parte de la secuencia, que concluye en TVF, después de la cual los aminoácidos no son esenciales para la unión antigénica. Como tal, el sitio BbsI en la secuencia de ácido nucleico puede usarse como un sitio conveniente para preparar una región variable de ratón funcional, por ejemplo, para su uso en injerto sobre una región constante humana (FIG. 2B).

25 En la práctica, la secuencia 3G4-2BVL se ha injertado sobre una región constante humana K en el sitio BbsI usando un vector pEE de Lonza. El producto resultante contiene la secuencia líder de ratón y su VL está unida dentro de la secuencia CL1 humana de una manera mostrada en la FIG. 2B, en la que IFPPSDEQLKSGTAS (SEC ID N°: 8) representa la primera parte de la secuencia de región constante K humana.

B. Generación y caracterización del anticuerpo quimérico humano 3G4

35 La construcción quimérica que contiene las regiones determinantes de complementariedad murinas y las regiones constantes humanas se ha producido (ch3G4) y se muestra que se comporta esencialmente de la misma manera que el anticuerpo murino original.

40 El anticuerpo 3G4 murino se ha convertido en un anticuerpo quimérico de humano-ratón (Avanir (Xenerex) Biosciences, San Diego, CA). La V_H murina se clonó y se injertó en la región constante γ 1 humana en el sitio BstEII del vector 2BVH de Lonza. La V_L murina se clonó y se injertó en la región constante K humana en el sitio BbsI del vector 2BVL de Lonza. Las secuencias se verificaron. Toda la construcción se expresó en células CHO y se purificó. El anticuerpo quimérico de ser humano/ratón ("humanizado") se denominó "bavituximab".

45 La unión de ch3G4 resultante al menos fue tan buena como el 3G4 murino a las placas de ELISA recubiertas con fosfolípido. El perfil de unión *in vitro* del 3G4 quimérico al panel de fosfolípidos se muestra en la FIG.4, en la que se muestra que la unión a PS, PA, CL y PI es similar. La unión fue específica de antígeno dado que no se observó unión con los anticuerpos de control de especificidad irrelevante. En determinados estudios, se observó una unión aparentemente mayor del 3G4 quimérico frente al anticuerpo 3G4; esto puede deberse a la unión superior del anticuerpo secundario.

C. Efectos antitumorales del anticuerpo humanizado

50 *In vitro*, ch3G4 se localiza en el endotelio vascular tumoral y ejerce efectos antitumorales. Los efectos antitumorales de ch3G4 en células de cáncer de mama humano MDA-MB-435 que se desarrollan en ratones se describe en el Ejemplo XI. El tratamiento de ratones con tumores MDA-MB-435 usando el anticuerpo quimérico retrasa de un modo eficaz el crecimiento tumoral en oposición a los de control.

55 La localización de ch3G4 se examinó en células de cáncer de mama humano MDA-MB-435 en crecimiento en ratones. Los ratones recibieron una inyección intravenosa de ch3G4 biotinilado o IgG de control de especificidad irrelevante. Una hora después, los ratones se exsanguinaron y sus tumores se extirparon y las secciones

congeladas se cortaron. Los reactivos biotinilados se incubaron primero con conjugado de estreptavidina-Cy3, se lavaron en PBS, después se incubaron con el anticuerpo MECA 32 seguido de anticuerpo secundario marcado con FITC. Imágenes sencillas, tomadas con filtros apropiados para fluorescencia de Cy3 (rojo) y FITC (verde) respectivamente, se capturaron con una cámara digital y se transfirieron a un ordenador. Las imágenes convergidas demostraron un color amarillo (un producto de mezclar la fluorescencia verde y roja) se superpusieron con la ayuda del programa informático Metaview.

En este método de doble tinción, las proteínas biotiniladas y el endotelio vascular se marcaron con rojo y verde. Cuando las proteínas biotiniladas se unían al endotelio, la imagen convergida apareció de color amarillo. El ch3G4 biotinilado se unía al endotelio vascular tumoral, porque los compañeros de tinción convergen con el de MECA 32.

También se marcó con radiación el bavituximab y se mostró que localizaba tumores prostáticos singénicos en ratas. La perfusión tumoral reducida también se observó en ratas portadoras de tumores tratadas con bavituximab.

D. Generación y caracterización del isotipo IgG2a recombinante de 3G4

La quimera humana del anticuerpo 3G4 murino (ch3G4) es un isotipo de IgG₁ humano (hIgG₁). El homólogo de IgG murino de ch3G4 requiere un isotipo IgG_{2a} de ratón (mIgG_{2a}). Esta construcción se realizó y se ensayó y se muestra que se comporta esencialmente igual que el anticuerpo parental.

Los vectores de expresión de Lonza pEE12.4 y pEE6.4 se obtuvieron de Lonza Biologics mediante un acuerdo con Peregrine Pharmaceuticals Inc. El uso de los vectores, transfección y exploración de las células de mieloma de ratón NS0 transfectadas se realizó de acuerdo con los Procedimientos Operativos de Lonza Biologics para su uso con: "células de Mieloma NS0". En resumen, la secuencia codificante de la cadena ligera de 3G4 se amplificó mediante RT-PCR a partir de ARN total aislado de la línea celular de hibridoma de 3G4. Se diseñaron cebadores de la RT-PCR de tal manera que el fragmento amplificado contenía los sitios enzimáticos de restricción XmaI y EcoRI en cada extremo del producto amplificado para la clonación en el vector pEE12.4 de Lonza.

La región variable de la cadena pesada de 3G4 se amplificó mediante RT-PC a partir de ARN total aislado de la línea celular de hibridoma de 3G4. Se diseñaron cebadores de tal manera que el fragmento amplificado contenía los sitios enzimáticos de restricción HindIII y XmaI en cada extremo del producto amplificado para la clonación en el vector pEE6.4 de Lonza. La región constante de IgG2a murina se amplificó por PCR a partir de un vector plasmídico proporcionado por el Dr. Shozo Izui. Los cebadores de la PCR se diseñaron con los sitios enzimáticos de restricción BstII y EcoRI en cada extremo del producto de amplificación para la clonación en el vector pEE6.4 + 3G4VH. Cabe destacar que el sitio BstEII se diseñó para que estuviese en fase con la secuencia de la región variable VH de 3G4 cadena arriba. Las construcciones de la cadena pesada y ligera se combinaron en un solo vector génico doble (IgG2a 3G4 12.4) cortando ambos vectores con Sall y NotI. Las regiones codificantes de la cadena pesada y ligera se verificaron secuenciando en la instalación principal de secuenciación de UT Southwestern.

El vector de IgG2a 3G4 12.4 se transfectó en células NS0 por electroporación. Después de la transfección, las células NS0 se diluyeron y se sembraron en placas en placas de 96 pocillos en medios que carecían de glutamina. Únicamente las células transfectadas con la construcción (que contenía el gen glutamina sintetasa para la selección positiva) pueden crecer en ausencia de glutamina. Durante los siguientes dos meses, se identificaron transfectantes diversos explorados para la secreción de anticuerpos mediante PS-ELISA. Los transfectantes que segregaban las cantidades más elevadas de anticuerpo se desarrollaron en cultivos grandes para generar anticuerpos purificados. Los anticuerpos se purificaron usando el mismo protocolo de purificación que se usó para el anticuerpo 3G4.

Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de IgG2a y la Cadena Ligera de 3G4 (C_κ) se representan por SEC ID N°: 10 y SEC ID N°: 11, respectivamente, como se muestra en la FIG. 2C y FIG. 2D.

Como se esperaba, los anticuerpos 2aG4 purificados migran sobre un gel SDS-PAGE como una banda de 150 kDa y se unen a PS en ELISA PS con una afinidad y especificidad esencialmente igual que para 3G4. Por tanto 2aG4 se une a fosfolípidos aniónicos con el mismo perfil que 3G4 (véase Tabla 4, anteriormente).

El isotipo IgG_{2a} de ratón se generó principalmente para proporcionar un mejor modelo para la quimera humana, ch3G4 (bavituximab). También se piensa que el isotipo IgG_{2a} de ratón es más estable que el IgG₃ de ratón, el isotipo normal del anticuerpo 3G4 murino. El anticuerpo 2aG4 puede generar un efecto antitumoral más fuerte que el IgG₃ de 3G4, mediante una ADCC potenciada.

El anticuerpo 2aG4 se ha ensayado en un estudio preliminar en un modelo WiDr de ratón (carcinoma de colon), junto con los anticuerpos 3G4 y ch3G4 y el anticuerpo C44 como un control. El tratamiento comenzó el día 5, cuando los tumores eran pequeños (10 ratones por grupo). Se inyectaron 100 µg de cada anticuerpo 3 veces/semana y se controló el crecimiento tumoral. Los tres anticuerpos ensayados redujeron el crecimiento tumoral a básicamente el mismo grado.

EJEMPLO XX**Anticuerpo 3G4 en terapias de combinación, incluyendo docetaxel**

El presente ejemplo se refiere a terapias de combinación para el tratamiento tumoral usando el anticuerpo 3G4 y el fármaco quimioterapéutico, docetaxel. Estos agentes se diseñaron para atacar las células endoteliales de la vasculatura tumoral y compartimentos celulares tumorales que conducen a un tratamiento sinérgico con una menor toxicidad. Los resultados muestran que esta terapia de combinación potencia significativamente de hecho la eficacia del tratamiento.

A. Efectos antitumorales mediados por el dominio Fc

Los efectos inhibidores del anticuerpo 3G4 se ensayaron en células tumorales *in vitro*. No se observó un efecto inhibitorio directo en las células tumorales. Por lo tanto, es probable que los efectos antitumorales del anticuerpo 3G4 incluyan un aumento de funciones efectoras inmunitarias mediado por el dominio Fc, tales como fagocitosis mediada por anticuerpos, ADCC, CDC y estimulación de producción de citocinas o estos mecanismos combinados.

Los efectos de 3G4 sobre la fagocitosis de células positivas PS por macrófagos se han evaluado. Se trataron células tumorales fluorescentes con H₂O₂ para inducir la exposición a PS. Las células tratadas y no tratadas se recogieron después y se pusieron en contacto con el anticuerpo 3G4 o con un anticuerpo de control (BBG). Después, se añadieron macrófagos de médula ósea de ratón, y se analizó la capacidad de los macrófagos para fagocitar las células tumorales fluorescentes usando un microscopio fluorescente.

Se determinó que 3G4 podría aumentar la fagocitosis de células positivas a PS por macrófagos en más de tres veces. Este descubrimiento confirma el razonamiento de los inventores de que el dominio Fc del anticuerpo 3G4 contribuye a los efectos antitumorales del anticuerpo. Es decir, el dominio Fc activa las funciones efectoras inmunitarias hospedadoras, que después ejercen efectos antitumorales. El anticuerpo 3G4 debería por tanto potenciar la actividad lítica de células NK, conduciendo a una ADCC más eficaz.

B. Docetaxel induce la exposición a PS en células endoteliales y vasos tumorales

La inducción de la exposición de PS en células endoteliales mediante concentraciones subclínicas de docetaxel se examinó *in vitro* mediante análisis FACS. Se trataron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y células endoteliales de microvasos humanos (HMVEC) con 10 nM de docetaxel durante 24 h y se examinaron por FACS. Tanto las HUVEC como las HMVEC tratadas mostraron un aumento significativo en la unión a 3G4 en comparación con las células no tratadas. También se realizaron incubaciones con docetaxel durante 48 y 72 h.

El tratamiento de células HUVEC *in vitro* con concentraciones de docetaxel a 20 pM también causó que los fosfolípidos aniónicos se externalizaran sin inducir apoptosis.

C. Docetaxel induce la exposición de PS en células tumorales

La inducción *in vitro* de la exposición de PS mediante concentraciones subclínicas de docetaxel también se examinó mediante análisis de FACS usando un panel de líneas celulares tumorales. Se trataron células de carcinoma de pulmón de Lewis de ratón 3LL, Colo26 de carcinoma de colon de ratón y cáncer de mama humano MDA-MB-435 con 10 nM de docetaxel durante 24 h y se examinaron por FACS. Todas las líneas celulares tumorales ensayadas mostraron un aumento significativo en la unión de 3G4 en comparación con las células no tratadas. También se realizaron incubaciones con docetaxel durante 48 y 72 h. Adicionalmente se examinaron líneas celulares tumorales B16 de melanoma de ratón y Meth A de fibrosarcoma de ratón y también mostraron un aumento significativo en la unión a 3G4 en comparación con las células no tratadas.

Las células MDA-MB-231 de cáncer mamario humano se trataron con 10 nM de docetaxel durante 24 h y se incubaron con cualquiera del anticuerpo 3G4 quimérico (ch3G4) o control, IgG humana y se analizaron por FACS. Estos resultados muestran que el aumento significativo en la unión del anticuerpo es específico de antígeno y que el anticuerpo quimérico se comporta de manera similar al anticuerpo 3G4 parental.

D. Docetaxel induce la exposición de PS en vasos tumorales

Los resultados a partir de estudios controlados también mostraron que docetaxel aumenta la exposición de PS en vasos tumorales. En dichos estudios, el tratamiento con docetaxel de ratones aumentó el porcentaje de vasos tumorales que exponen fosfolípidos aniónicos del 35 % al 60 %. No se observó inducción de PS en vasos en tejidos normales incluso después de tratamiento sistémico con docetaxel.

E. Tratamiento tumoral sinérgico con 3G4 y docetaxel

Por tanto los inventores mostraron que el tratamiento de células endoteliales y de células tumorales con docetaxel a concentraciones subclínicas aumenta significativamente la unión a 3G4. También demostraron que el anticuerpo 3G4 facilita la fagocitosis mediada por macrófagos de células tumorales en las que se expone PS en la superficie. La unión de 3G4 aumentada mediada por docetaxel podría por tanto aumentar la fagocitosis de células tumorales y

otros efectos antitumorales mediados por el dominio Fc del anticuerpo 3G4, tal como aumento de la actividad lítica de células NK, lo que conduce a una ADCC más eficaz. Estudios de otros autores también demostraron que el tratamiento de pacientes con cáncer de mama con docetaxel conduce a un aumento en suero de IFN- γ , IL-2, IL-6 y niveles de citocina GM-CSF y una potenciación de la actividad de células NK y LAK (Tsavaris *et al.*, 2002).

- 5 El efecto antitumoral de la terapia combinada de 3G4 con docetaxel fue por lo tanto examinado en un modelo ortotópico en ratones SCID portadores de carcinoma humano MDA-MB-435. Los ratones portadores de tumor mamario humano MDA-MB-435 ortotópico se trataron i.p. solo con 3G4 (100 μ g/dosis), solo docetaxel (10 mg/kg) o 3G4 en combinación con docetaxel (100 μ g/dosis y 10 mg/kg, respectivamente) durante tres semanas, con la administración 3 veces a la semana. El tratamiento comenzó 6 días después del implante de las células tumorales.
- 10 Estos estudios mostraron que el tratamiento de ratones portadores de tumores mamarios humanos MDA-MB-435 ortotópicos con 3G4 más docetaxel inhibió el crecimiento tumoral en 93 %. El tratamiento de ratones portadores de tumores MDA-MB-435 diseminados con 3G4 más docetaxel redujo el número promedio de colonias tumorales en los pulmones en 93 % y la mitad de los animales no desarrollaron tumores. En ambos modelos tumorales, el efecto antitumoral de la combinación fue estadísticamente superior ($p < 0,01$) que el de docetaxel o 3G4 en solitario. La
- 15 terapia de combinación redujo la densidad de los vasos tumorales y el volumen plasmático en tumores a un mayor grado que lo hicieron los fármacos individuales. La terapia de combinación no fue más tóxica en los ratones que lo fue solo con docetaxel. Estos resultados indican que, como una terapia adyuvante, 3G4 podría potenciar el efecto terapéutico de docetaxel en pacientes con cáncer de mama.

F. 3G4 potencia la actividad de cisplatino contra tumores mamarios resistentes a fármacos

- 20 El anticuerpo 3G4 también potencia la actividad de cisplatino contra tumores de mama resistentes a fármacos en animales. Los ratones se inocularon con tumores de mama resistentes a fármacos y se trataron después del día 20. Los grupos de tratamiento fueron solo cisplatino, solo con el anticuerpo 3G4, un anticuerpo de control del mismo isotipo (BBG3) o cisplatino en combinación con el anticuerpo 3G4.
- 25 Los tumores en los animales de control continuaron desarrollándose rápidamente. En los ratones tratados con cualquiera de cisplatino en solitario o solo el anticuerpo 3G4, el crecimiento tumoral se redujo. El grupo de tratamiento de combinación (cisplatino y anticuerpo 3G4) mostró la mejor respuesta antitumoral. Por tanto, los anticuerpos tales como 3G4 potencian la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos, tales como cisplatino, incluso contra tumores resistentes a fármacos.

G. Terapia de combinación de cáncer pancreático

- 30 Existe una urgente necesidad de mejorar los tratamientos para el cáncer pancreático. En seres humanos, la supervivencia prolongada general para pacientes con cáncer pancreático es menor del 4 %. Aproximadamente 70-80 % de los pacientes con cáncer pancreático fracasan en la terapia debido a metástasis en el hígado, y normalmente no hay terapia que sea eficaz para la enfermedad metastásica.
- 35 Se inyectaron células de adenocarcinoma pancreático de ratón Pan02 en el páncreas de ratones C57BL/6 inmunocompetentes. El tratamiento comenzó el día 5 después de la inyección de las células tumorales. Los grupos de tratamiento fueron PBS como control, el anticuerpo 3G4 en solitario (100 μ g), solo gemcitabina (3,5 mg), o el anticuerpo 3G4 en combinación con gemcitabina (100 μ g y 3,5 mg, respectivamente). La gemcitabina es una pirimidina anti-metabolito. Los animales se sacrificaron el día 22 después de la inyección de las células tumorales y el peso tumoral se determinó.
- 40 En estos estudios, tanto la gemcitabina como el anticuerpo 3G4 mostraron un efecto antitumoral significativo. Los animales tratados con gemcitabina en combinación con el anticuerpo 3G4 mostraron un efecto antitumoral significativamente potenciado sobre cada agente en solitario, sin efectos adversos, por ejemplo, en pérdida de peso. La metástasis nodal, peritoneal y hepática también se redujo significativamente en el tratamiento con cualquiera de gemcitabina o solo con el anticuerpo 3G4. De nuevo, los animales tratados con gemcitabina en combinación con el
- 45 anticuerpo 3G4 mostraron una metástasis nodal, peritoneal y hepática significativamente reducida cuando se comparaba con cada agente en solitario. Cabe destacar que en los animales tratados con la combinación de gemcitabina y el anticuerpo 3G4, no hubo metástasis detectable en el hígado. Esto es significativo, ya que en seres humanos, las metástasis en el hígado son la causa más frecuente de muerte después del diagnóstico de cáncer pancreático.
- 50 Estos estudios también muestran una infiltración significativa de macrófagos en el tumor en el grupo de tratamiento de combinación. La densidad de los microvasos se redujo después del tratamiento con el anticuerpo 3G4 en solitario y con el anticuerpo 3G4 en combinación con gemcitabina.

H. Tratamiento de cáncer de pulmón con radiación y 3G4

- 55 En estudios de ratones con cáncer de pulmón, la irradiación focal con 10 Gy indujo la exposición de PS en el endotelio de vasos sanguíneos tumorales, como se muestra en estudios de doble marcaje. En la fase de tratamiento, tanto la irradiación como el anticuerpo 3G4 en solitario mostraron un efecto antitumoral. De nuevo, la combinación

de modalidades de tratamiento, es decir, irradiación y el anticuerpo 3G4, mostraron el mayor efecto antitumoral.

I. El direccionamiento de 3G4 de células tumorales apoptóticas a Fc γ R en células dendríticas

5 Los tumores de ratones tratados con 3G4 más docetaxel también contenían cantidades inusuales de linfocitos, en comparación con los tumores de control. Aunque este fenómeno podría representar quimioatracción típica de las células inmunitarias disgregando células tumorales, también podría reflejar la activación del sistema inmunitario mediante la unión de Fc a través de 3G4 a Fc γ R en células efectoras inmunitarias.

10 Para caracterizar los efectos de la administración de 3G4 y de docetaxel en el infiltrado celular inmunitario intratumoral, pueden identificarse los tipos de células presentes en estos infiltrados por inmunotinción de secciones congeladas y/o secciones en parafina de tejidos tumorales usando anticuerpos dirigidos contra marcadores específicos de macrófagos, neutrófilos, granulocitos, células NK y linfocitos activados (Pharmingen, San Diego, CA). El grado, fenotipo y estado de activación de este infiltrado puede graduarse. La producción de citocinas a través de la infiltración de células inmunitarias, incluyendo IL-2 e INF, también puede analizarse mediante técnicas inmunohistoquímicas. Los niveles de citocinas en suero pueden evaluarse por ELISA y tinción intracelular pueden usarse para identificar los compartimentos celulares específicos responsables de la producción de citocinas. Los efectos de las células inmunitarias infiltrantes en la proliferación celular tumoral y apoptosis pueden por tanto evaluarse sistemáticamente.

20 A la luz de los datos anteriores, los autores de la invención contemplaron adicionalmente métodos que potenciaban la fuerza de la inmunoterapia del cáncer de mama mediante el direccionamiento de células tumorales apoptóticas mediado por 3G4 al receptor Fc gamma (Fc γ R) en células dendríticas. La presentación eficiente del antígeno, que induce respuestas inmunitarias celulares y humorales eficaces, es importante para el desarrollo de vacunas tumorales e inmunoterapias. Las células dendríticas (CD) son las células presentadoras del antígeno (CPA) más fuertes, que sensibilizan a los linfocitos T citotóxicos contra antígenos asociados a tumores. La mejora de la presentación antigénica tumoral mediante las células dendríticas (CD) podría conducir al desarrollo de vacunas tumorales más fuertes.

25 La presentación antigénica mediante la internalización mediada por el receptor Fc γ R de las CD puede potenciarse hasta 1.000 veces en comparación con la pinocitosis antigénica en fase fluida. Las células tumorales apoptóticas (CTA) son una excelente fuente de antígenos para la carga de células dendríticas porque pueden presentarse de un modo eficaz múltiples antígenos específicos de tumor (tanto conocidos como desconocidos) a linfocitos T sin tratar, lo que hace que aparezcan variantes de escape inmunitarias menos probablemente debido al bloqueo de determinados epítomos. En estudios con animales, se ha demostrado que las CD impulsadas con CTA producen una potente inmunidad antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, datos recientes han demostrado que las CTA en solitario fueron algo menos eficaces para activar la inmunidad antitumoral, posiblemente debido a su capacidad insuficiente e incapaz para inducir la maduración de CD.

35 Recientes estudios también han demostrado que el complejo CTA-inmunitario, formado por la unión de anticuerpo antitumoral contra células tumorales apoptóticas, puede dirigirse a Fc γ R en CD. En comparación con las CTA en solitario, los complejos CTA-inmunitarios se internalizaban de un modo más eficaz mediante CD, más eficaz en la inducción de la activación de CD y maduración, y lo que es más importante, los complejos CTA-inmunitarios pueden potenciar significativamente tanto la presentación antigénica limitada de MHC I y II, por lo tanto inducir una potente inmunidad CTL y auxiliares T antitumorales.

40 Los inventores por tanto consideran el uso de anticuerpos anti-PS de la presente invención para potenciar inmunidad antitumoral tanto hormonal como celular, y reforzar la eficacia de vacunas tumorales con CD basadas en CTA. Como PS es un marcador específico universal y el más abundante de las células tumorales apoptóticas, el panel de anticuerpos de la invención, particularmente 3G4, puede unirse a PS en CTA. Los inventores han demostrado ya que 3G4 puede potenciar la captación de CD en células tumorales apoptóticas un 300 % a través de la internalización mediada por Fc γ R de complejos 3G4-CTA. Potenciando la captación de CTA por CD mediante Fc γ R, se razona por lo tanto que los anticuerpos 3G4 y similares puedan potenciar enormemente la presentación antigénica limitada tanto a MHC I como a II, inducir tanto la inmunidad antitumoral hormonal como celular fuerte y reforzar la eficacia de las vacunas tumorales de CD basadas en CTA. Esto puede demostrarse estableciendo la eficacia de CD cargadas con complejos inmunitarios 3G4-CTA en la inducción de T h1, CTL y respuesta de anticuerpos *in vivo* y determinando la fuerza de la inmunidad antitumoral inducida por la inmunización de CD cargada con complejos inmunitarios 3G4-CTA *in vivo*.

EJEMPLO XXI

Los anticuerpos anti-PS tratan infecciones CMV *in vivo*

55 Después de los efectos antivíricos contra CMV *in vitro* mostrados en el Ejemplo XII, el presente ejemplo demuestra la supervivencia potenciada de ratones infectados con la versión murina de virus CMV, mCMV.

Se infectaron ratones Balb/C (de 6 semanas de vida, cinco ratones por grupo) por vía i.p. con 5×10^5 ufp de mCMV

RVG102. Los ratones se trataron i.p. el día 1 con el anticuerpo 3G4 (1 mg/ratón), o el anticuerpo quimérico ser humano-ratón, ch3G4 descrito anteriormente (1 mg/ratón). Los ratones no tratados sirvieron como control. Los ratones se trataron cada cuatro días después de esto con 0,5 mg/ratón de anticuerpo o anticuerpo quimérico hasta el día 26. Los ratones se monitorizaron para la supervivencia pasados los 90 días post-infección.

- 5 El tratamiento con las formas tanto quiméricas como parentales del anticuerpo 3G4 dieron como resultado un aumento de la supervivencia de los ratones infectados con mCMV. Los ratones tratados con 3G4 o con ch3G4 tuvieron una supervivencia del 100 % y del 80 %, respectivamente, en comparación con los ratones no tratados, en los que únicamente 25 % de los ratones sobrevivieron a la infección.

EJEMPLO XXII

El derivado peptídico de unión a PE trata la infección de CMV *in vivo*

Además de los efectos antivíricos *in vitro* contra el CMV mostrados en el Ejemplo XVII, este ejemplo demuestra que el derivado de duramicina-biotina, DLB aumenta la supervivencia de ratones infectados con mCMV.

- 15 Se infectaron ratones Balb/C (6 semanas de vida, cinco ratones por grupo) por vía i.p. con 5×10^5 ufp de mCMV RVG102. Los ratones se trataron por vía i.p. el día 1 y cada cuatro días con 20 μ g/ratón del derivado de duramicina, DLB. Los ratones no tratados sirvieron como control. Los ratones se monitorizaron para la supervivencia pasados 90 días después de la infección.

El tratamiento con el derivado de duramicina-biotina, DLB potenció la supervivencia de los ratones infectados con mCMV. Los ratones tratados con DLB tuvieron una supervivencia del 100 %, en comparación con los ratones no tratados, en los que únicamente 25 % de los ratones sobrevivieron a la infección.

EJEMPLO XXIII

Los anticuerpos anti-PS se unen a células infectadas con virus

- 25 El presente ejemplo muestra que la infección vírica induce la exposición de PS en la superficie celular y que los anticuerpos anti-PS se unen a células infectadas con virus. Las células infectadas con el virus de la vacuna comienzan a volverse positivas para PS, como se muestra mediante un aumento de la unión del anticuerpo 3G4 quimérico a la superficie celular lo que se ha demostrado por análisis FACS.

Las células U937 se infectaron con el virus Vaccinia sometido a tripsina a una alta m.o.i. de 2. En resumen, el virus Vaccinia se trató con el mismo volumen de 0,25 mg/ml de tripsina durante 30 minutos a 37 °C. El virus se añadió a células U937 en un volumen de 0,5 ml. Después de 1,5 h, se añadió medio reciente a las células y las células se incubaron en un matraz T25 a 37 °C durante 2 días. Las células no infectadas sirvieron como controles.

- 30 Las células infectadas y no infectadas U937 se tiñeron con un anticuerpo primario, bien con el anticuerpo 3G4 quimérico (ch3G4) o con IgG humana (HlgG) como control. Las células se lavaron, se bloquearon con suero murino normal y después se tiñeron con el anticuerpo primario durante 45 minutos en hielo. Después de tres lavados, las células se tiñeron con una dilución de 1:400 del anticuerpo secundario anti-humano conjugado con FITC de cabra y se analizaron en un FACScan.

- 35 Los resultados de los análisis FACS muestran que hubo un cambio significativo con ch3G4 en células U-937 infectadas con el virus Vaccinia, en comparación con lo obtenido en células U937 no infectadas. Por lo tanto este estudio muestra que la infección de células con virus Vaccinia conduce a una exposición de PS sobre la superficie celular y que la versión quimérica del anticuerpo anti-PS, 3G4 es capaz de unirse a estas células infectadas con virus.

EJEMPLO XXIV

Efectos antivíricos de los anticuerpos anti-PS frente al virus Pichinde

Además de los efectos antivíricos contra CMV y VSR, el presente ejemplo muestra adicionalmente que los anticuerpos anti-PS inhiben la infección del virus Pichinde *in vitro*. El virus Pichinde es un arenavirus del Nuevo Mundo que no es patógeno en seres humanos y se usa en un modelo animal para la fiebre de Lassa.

- 45 Se trataron monocapas confluentes de células Vero con el anticuerpo 3G4 o con un anticuerpo de control del mismo isotipo, GV39G, después de infección con el virus Pichinde a una m.o.i. baja de 0,01 ufp/célula. En resumen, las células se incubaron con virus en un volumen total de 1 ml por pocillo a 37 °C durante 90 minutos. Durante la infección, las placas se movieron suavemente cada 30 minutos. Después de la infección, el sobrenadante celular se retiró y se añadió DMEM/FBS al 10 %/pen-strep a cada pocillo (2 ml por pocillo). El día 2, las células se recogieron con tripsina y se dejaron adherirse a portaobjetos de cámara Biocoat. Se fijaron y se tiñeron con suero policlonal de conejo anti-PIC seguido por un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con biotina (solo el anticuerpo secundario no produce tinción). El número de células infectadas por campo de 100 células se contó.

En las células tratadas con 3G4, el virus está limitado a células individuales que se tiñen de un color rojo oscuro, en un número aproximado de una de aproximadamente cien células. Probablemente estas células estaban originalmente infectadas por el virus, como se observa con CMV (Ejemplo XII). Sin embargo, en células tratadas con el control, anticuerpo GV39G, el virus se diseminó e infectó todas las células.

- 5 Este patrón de inhibición de replicación vírica es similar al observado cuando se usa 3G4 para tratar fibroblastos humanos infectados por CMV. Por tanto, el anticuerpo anti-PS, 3G4 previene de un modo eficaz y cuantificable la dispersión del virus Pichinde de célula a célula.

EJEMPLO XXV

El tratamiento tumoral usando derivado peptídico de unión a PE

- 10 Además de los efectos antivíricos de los derivados de duramicina, tanto *in vitro* como *in vivo*, el presente ejemplo demuestra la localización de los derivados de duramicina en la vasculatura tumoral y efectos antitumorales asociados.

A. Tratamiento tumoral con el conjugado de duramicina-HulgG

- 15 En primer lugar se purificó la IgG humana (HlgG) como se describe en el Ejemplo XV. La HlgG purificada se ligó a duramicina usando el enlazador SIAB, y el conjugado resultante (D-SIAB)_nHlgG se purificó.

- 20 Se cultivó la línea celular de fibrosarcoma de ratón MethA, se recogió a una fase logarítmica y se resuspendió en DPBS. Se inyectaron aproximadamente 10⁵ células tumorales MethA por vía subcutánea en el dorso central de ratones macho BALB/c de 6-8 semanas de vida. 5 días después del implante, los ratones se separaron al azar en dos grupos (*n*=15). Desde el día 10, un grupo recibió 150 µg de conjugado de duramicina-HulgG mediante inyección intraperitoneal durante 2 semanas consecutivas. El otro grupo recibió la misma cantidad de HulgG como control. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces a la semana y se calcularon usando la fórmula $1/2ab^2$, (en la que "a" es el eje longitudinal y "b" es el eje corto del tumor). Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 1400 mm³.

- 25 El conjugado duramicina-HlgG inhibió el crecimiento tumoral MethA en ratones BALB/c a una dosis de 150 µg/día, en comparación con el control de IgG humano.

B. El conjugado de duramicina-HulgG se localiza en la vasculatura tumoral

- 30 Usando el mismo modelo tumoral de ratón MethA como se indica anteriormente, cuando el tamaño del tumor alcanza 500 mm³, se inyectan 100 µg de (D-SIAB)_nHlgG en 100 µl de PBS a través de la vena de la cola. Como control se inyectó la misma cantidad de IgG humana. Después de 4 horas, los ratones se sacrificaron y se perfundieron con solución salina normal durante 5 minutos y paraformaldehído al 1 % durante 10 minutos. El tumor y otros órganos principales se diseccionaron y se congelaron en nitrógeno líquido. Después de incorporarse en OCT, el tejido se crio seccionó en una sección de 10 µm y se colocó en portaobjetos silanizados. Después de fijar en acetona fría durante 10 minutos, los portaobjetos se tiñeron con anti-IgG humano de cabra marcado con peroxidasa para detectar la biodistribución de la duramicina-HulgG. El anticuerpo de cabra anti-IgG de rata marcado con peroxidasa y Meca32 se usaron para detectar la vasculatura sanguínea de los tejidos.

- 35 Este estudio muestra que el conjugado de duramicina-HlgG se localiza en la vasculatura tumoral en los animales tratados.

EJEMPLO XXVI

Biodistribución y propiedades de los conjugados de duramicina

- 40 El presente ejemplo demuestra la ausencia de toxicidad de los derivados de duramicina impermeables en la célula *in vitro*, la biodistribución de los derivados de duramicina administrados *in vivo* y la capacidad de los conjugados duramicina-anticuerpo para aumentar la fagocitosis de las células apoptóticas por macrófagos.

A. Los conjugados de duramicina-biotina no son citotóxicos

- 45 Los derivados de duramicina y conjugados de la invención se diseñan para minimizar los efectos tóxicos no específicos de la molécula de duramicina parental. En muchos ejemplos, esto se consigue uniendo la duramicina a un grupo impermeable a células (Ejemplo XV).

- 50 La construcción de duramicina biotilada DLB se preparó como se describe en el Ejemplo XV. El compuesto de duramicina no modificado y DLB se ensayaron con respecto a sus efectos citotóxicos en HUVEC usando el ensayo MTT. Aunque la duramicina no modificada mostró una toxicidad dependiente de la dosis, la DLB no fue tóxica, del mismo modo que el control no tratado.

B. Localización del conjugado de duramicina-biotina en macrófagos en pulmones

La línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-435 se cultivó, se recogió a una fase logarítmica y se resuspendió en DPBS. Aproximadamente 10^7 células se inyectaron en el pániculo adiposo mamario de ratones desnudos etílicos hembra de 6-8 semanas de vida. Se inyectaron 100 μg de duramicina-biotina en 100 μl de PBS a través de la vena de la cola. Después de 4 horas, los ratones se sacrificaron y se perfundieron con solución salina normal durante 5 minutos y paraformaldehído al 1 % durante 10 minutos. Los órganos principales, incluyendo corazón, pulmón, hígado, riñón, cerebro, intestino, testículos y bazo se diseccionaron y se congelaron en nitrógeno líquido. Después de incorporar en OCT, el tejido se crioseccionó en secciones de 10 μm y se colocó en portaobjetos silanizados. Después de fijar en acetona fría durante 10 minutos, los portaobjetos se tiñeron con estreptavidina marcada con Cy3 para detectar la biodistribución de la construcción duramicina-biotina. Para detectar la vasculatura sanguínea de tejido se usaron Meca32 y anti-IgG de rata de cabra marcado con FITC.

La inyección intravenosa del conjugado duramicina-biotina en ratones desnudos portadores de tumores MDA-MB-435 dio como resultado la deposición del fármaco en las células tumorales, túbulos renales y en los macrófagos en el pulmón. Hubo una deposición mínima en hígado y no hubo distribución detectable en cerebro, intestino, testículos. La localización de los macrófagos en el pulmón aprovecharse en las realizaciones antivíricas de la invención.

15 C. El conjugado de duramicina-anticuerpo potencia la fagocitosis de células apoptóticas

La capacidad de un conjugado de duramicina-anticuerpo (duramicina-C44, DuC44) para aumentar la fagocitosis de células apoptóticas se investigó después.

Se aislaron macrófagos y se cultivaron de médula ósea de ratón. El medio usado para el aislamiento, cultivo y estimulación de macrófagos BM fue DMEM que contenía glutamina 2 mM, NaHCO_3 0,37 % (p/v), FCS termo-inactivado al 10 % (v/v) y GM-CSF de ratón 0,5 ng/ml. Las células de médula ósea se lavaron abundantemente asépticamente a partir de los fémures diseccionados mediante un chorro de medio completo dirigido a través de una aguja de calibre 25. Después las células se ajustaron a una densidad de aproximadamente 3×10^5 células/ml de medio completo y se distribuyeron en alícuotas de 0,5 ml en portaobjetos de cámara de 8 pocillos.

Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C en CO_2 al 5 %, en una cámara húmeda para permitir que los macrófagos se adhieran y se distribuyan. Las células no adherentes se retiraron añadiendo 5 ml de PBS caliente a cada pocillo, las células no adherentes se resuspendieron golpeando moderadamente la placa y sacudiendo los portaobjetos para desechar las células no adherentes. Este lavado se realizó un total de tres veces. Las células se mantuvieron a 37 °C con una atmósfera de CO_2 al 7,5 % (v/v) durante 5 días. El medio completo se cambió cada dos días hasta que se usaron las células.

Se usó el siguiente método para marcar células diana HL-60 con un trazador de células fluorescentes. Se preparó una solución de reserva SE CFDA 10 mM inmediatamente antes del uso disolviendo los contenidos del colorante del vial en 90 μl de DMSO y diluyendo en PBS a 10 μM . Se usó la centrifugación para obtener un sedimento celular de HL-60 y se aspiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en CFDA/PBS y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. Las muestras se centrifugaron y se aspiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en medio y se incubaron durante otros 30 minutos. Se confirmó que la viabilidad celular y la fluorescencia eran más del 95 %.

En este ensayo de fagocitosis, las células HL-60 marcadas se expusieron a UV 254 nm durante 5 minutos y se incubaron a 37 °C durante una hora para inducir la apoptosis. Se incubaron 10^4 células HL-60 apoptóticas con macrófagos durante una hora. El conjugado de duramicina-C44 se incluyó a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se usó la misma concentración de anticuerpo BBG3 de ratón como un control negativo, y también se incluyó el anticuerpo 3G4 para la comparación. Se añadió Hoechst 33342 en el medio en los últimos 45 minutos a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Los portaobjetos se lavaron con PBS 3 veces y se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con anticuerpo de rata anti-CD11 de ratón (CD11 es un marcador de macrófagos), se diluyeron en gelatina al 0,2 % durante una hora, se lavaron y se tiñeron con rojo Texas marcado con anticuerpo secundario de cabra anti-rata.

Las células se analizaron con el microscopio fluorescente. Los macrófagos se identificaron como células rojas, debido al marcador CD11. Los macrófagos que habían fagocitado células apoptóticas se identificaron como células de color verde, debido al trazador fluorescente en las células diana. Las células de color rojo y verde se contaron y se cuantificó la fagocitosis como el porcentaje de fagocitos positivos para la captación.

Este estudio muestra que el conjugado de duramicina-anticuerpo, DuC44 potencia la fagocitosis de células HL-60 apoptóticas por macrófagos. Por tanto, la parte de duramicina se une a la superficie de las células apoptóticas, lo que permite que la parte que sobresale del anticuerpo del conjugado sea reconocida por los macrófagos. El conjugado duramicina-anticuerpo por tanto funciona de manera similar al anticuerpo 3G4. Como se esperaba, un fragmento (Fab)₂ del anticuerpo 3G4, que carece de la región Fc, no indujo la fagocitosis por encima de los niveles de control.

Como un estudio anterior mostró que los conjugados de duramicina-biotina se localizaban en macrófagos en el pulmón después de la administración *in vivo*, la estimulación de fagocitosis mediada por macrófagos de células

apoptóticas mostrada en el presente estudio tiene importantes implicaciones para los usos terapéuticos de la presente invención, tal como en el tratamiento de infecciones víricas pulmonares.

EJEMPLO XXVII

Infiltración de macrófagos durante el tratamiento de tumores

5 Como se muestra en los estudios anteriores, los anticuerpos contra aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos son eficaces en el tratamiento de tumores. Por ejemplo, el anticuerpo 3G4 se localiza específicamente en vasos tumorales, que causa la destrucción de vasos tumorales y retrasa el crecimiento tumoral en modelos murinos múltiples sin causar toxicidad (Ejemplo XI; Ejemplo XVIII). El presente ejemplo muestra que el tratamiento de 3G4 de animales con tumores también causa leucocitos mononucleares que se unen al endotelio vascular tumoral e induce los macrófagos para infiltrarse en el tumor.

A. Métodos

15 Grupos de 8-10 ratones SCID hembra recibieron una inyección subcutánea de 2×10^7 células L540 o por vía ortotópica de 1×10^7 MDA-MB-435 o MDA-MB-231. Los ratones BALB/c recibieron una inyección subcutánea de células Meth A 1×10^6 . Se dejó que crecieran los tumores a un diámetro promedio de 0,8-1 cm (L540), 0,6-0,7 cm (MDA-MB-435), 0,5-0,7 cm (MDA-MB-231) o $<0,1$ cm (Meth A). Los ratones se trataron después i.p. con 100 μ g de anticuerpo 3G4 o de anticuerpo de control (BBG3) tres veces a la semana durante 2-3 semanas. Los animales se controlaron tres veces a la semana con respecto al tamaño del tumor y peso corporal. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores en los ratones de control alcanzaron un diámetro de 1,5-2 cm.

B. Resultados

20 El tratamiento con 3G4 de ratones portadores de tumores ortotópicos MDA-MB-435 y MDA-MB-231 causaron que los leucocitos mononucleares se unieran al endotelio tumoral vascular y se infiltraran en el intersticio tumoral (FIG. 6A, FIG. 6B, FIG. 6C y FIG. 6D). En esta figura, la tinción roja muestra endotelio, la tinción verde muestra macrófagos y la tinción azul muestra núcleos.

25 A menudo los vasos en los tumores tratados con 3G4 se empaquetaron con leucocitos mononucleares (FIG. 6D), mientras que solamente se observaron leucocitos ocasionales que se adherían a los vasos en los tumores de ratones de control, tratados con BBG3 (FIG. 6C). Los leucocitos mononucleares se infiltraron en el intersticio de tumores de ratones tratados con 3G4 en números muy mayores que en los ratones tratados con BBG3 (compárese la FIG. 6B y la FIG. 6A).

30 Casi todas las células (>90 %) que se adherían a los vasos tumorales y se infiltraban en los tumores expresaban los marcadores de monocitos/macrófago F4/80, M1/70 (CD11b, Mac-1) y Fc γ R (FIG. 6A, FIG. 6B, FIG. 6C y FIG. 6D). Las células carecían del marcador de neutrófilos, Ly-6G, el marcador de células NK, Ly-49, y el marcador de células dendríticas, CD11c. Los marcadores linfocíticos no estaban presentes, como se esperaba de ratones SCID. En su conjunto, estos resultados indican que las células que se adherían a vasos tumorales y que se infiltraban en el intersticio tumoral eran monocitos y macrófagos respectivamente.

EJEMPLO XXVIII

Los fragmentos F(ab')₂ son eficaces en el tratamiento de tumores

Los anticuerpos contra aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos, tales como el anticuerpo 3G4, son eficaces en el tratamiento tumoral (Ejemplo XI; Ejemplo XVIII). El presente ejemplo muestra que el fragmento F(ab')₂ del anticuerpo 3G4 es eficaz como un anticuerpo intacto 3G4 en el tratamiento de tumor.

40 En estudios controlados se trataron ratones con tumores (el día 9) con cualquiera del anticuerpo 3G4, el fragmento F(ab')₂ del anticuerpo 3G4 o un anticuerpo de control del mismo isotipo (BBG3). Los tumores en los animales de control continuaron creciendo rápidamente, mientras que en los ratones tratados con cualquiera del anticuerpo 3G4 o el fragmento F(ab')₂ del anticuerpo 3G4, el desarrollo del tumor disminuyó significativamente (FIG. 8). El fragmento F(ab')₂ era al menos tan eficaz como el anticuerpo intacto (FIG. 8), y el efecto antitumoral del efecto del fragmento F(ab')₂ puede haberse sobreestimado en estos estudios.

50 Esto confirma el propósito de que los anticuerpos tales como 3G4 potencian la capacidad de los monocitos y macrófagos para crear una respuesta inflamatoria contra la vasculatura y células tumorales que expresan PS. Los anticuerpos tales con 3G4 pueden impedir que PS sobre la vasculatura tumoral silencie las respuestas inflamatorias del hospedador, por tanto permitiendo que los macrófagos segreguen citocinas inflamatorias, tales como TNF- α , IL-1 y otras, directamente lesionando el endotelio tumoral y reclutando adicionalmente células hospedadoras en el tumor (FIG. 7).

EJEMPLO XXIX

El dímero de anexina V se localiza en vasos tumorales mejor que en los monómeros

El Ejemplo XXVII y el Ejemplo XXVIII se refieren a la función de los macrófagos en el tratamiento de tumores usando anticuerpos contra aminofosfolípidos y fosfolípidos aniónicos. A partir de estos datos y otra información, los inventores desarrollaron los aspectos de los receptorcuerpos de la invención en general. Como se confirma por dichas realizaciones, se generó un homodímero de anexina V y se encontró que se localizaba en vasos tumorales mejor que el monómero de anexina V correspondiente.

EJEMPLO XXX

La unión simultánea de 3G4 y β 2GPI contra PS

El presente ejemplo demuestra que la interacción entre el anticuerpo 3G4 y PS es dependiente de la proteína plasmática, la glucoproteína β 2 I (β 2GPI). 3G4 se une a β 2GPI en el dominio II, que no está ligado con anticuerpos patógenos aislados de pacientes con APS (que normalmente reconocen el dominio I de β 2GPI). Los datos muestran que los complejos divalentes 3G4/ β 2GPI se requieren para la unión a PS potenciada, incluyendo células positivas a PS, dado que los fragmentos Fab' de 3G4 no tienen esta actividad. La unión divalente de 3G4/ β 2GPI a células positivas para PS confirma el uso de la construcción Fc- β 2GPI de la invención, que también son dímeros, para dirigirse a células positivas para PS y por tanto tratan enfermedades tales como cáncer e infecciones víricas.

A. Materiales y Métodos

1. Materiales

El medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y tripsina/EDTA se obtuvieron en Mediatech, Inc. (Herndon, VA). El suero bovino fetal (FBS), el suero humano normal, el suero de rata normal y el suero de ratón normal se obtuvieron en Biomedica (Foster City, CA). El plasma humano reciente se obtuvo en Carter Blood Care (Dallas, TX). El Medio de Hibridoma asérico, complemento NSO de Synthechol, la L- α -fosfatidilserina (PS), la albúmina de suero bovino (BSA) y la ovoalbúmina de clara de huevo de pollo (OVA) y se obtuvieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La DEAE celulosa, la heparina-sepharose, y las membranas Hybon-P se obtuvieron en Amersham Biosciences (Buckinghamshire, RU). El 1-palmitoil-2-hidroxi- n -glicero-3-fosfocolina [lisofosfatidilcolina (LPC)] se obtuvo en Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Se obtuvieron microplacas de microtitulación de noventa y seis pocillos Immulon-IB y 2HB en Thermo Lab Systems (Franklin, MA). Se obtuvieron geles SDS-PAGE de gradiente tris-HCl y el kit de Sustrato Opti-4CN en Biorad (Hercules, CA). Se obtuvieron portaobjetos de cámara de vidrio de ocho pocillos en BD Biosciences (Bedford, MA).

2. Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal de ratón 3G4, que se suscitó que se uniera al fosfolípido aniónico PS, es el anticuerpo descrito en el Ejemplo IV y en otros ejemplos del presente documento (véase también, Ran *et al.*, 2005). 3G4 se produjo originalmente en el sobrenadante de hibridoma, pero posteriormente se convirtió en isotipo IgG2a de ratón (Ejemplo XTX, D) y ahora se produce en la línea celular de mieloma de ratón NSO.

Se cultivaron células NSO en DMEM complementado con FBS al 10 % o en Medio de Hibridoma asérico con complemento NSO de Sinthechol. También se generó una versión quimérica IgG1 humana de 3G4 (ch3G4) (Ejemplo XD1, B) y se produjo en condiciones aséricas por Peregrine Pharmaceuticals, Inc. (Tustin, CA). Este anticuerpo se había denominado bavutximab.

El mAb anti- β 2GPI humano de ratón (anti- β 2GPI o α - β 2GPI) se obtuvo en USBiological (Swampscott, MA). Un hibridoma que segrega C44, un mAb de IgG2a de ratón específico de colchicina se obtuvo en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD) y se usó como un control para 3G4 y anti- β 2GPI. El rituximab (mAb quimérico de IgG1 humano) se obtuvo en la farmacia de UT Southwestern y se usó como un control para ch3G4. Todos los anticuerpos producidos en los sobrenadantes del cultivo se purificaron como se describe en los ejemplos anteriores (véase también, Ran *et al.*, 2003). Todos los anticuerpos se obtuvieron en Jackson Immunoresearch Labs (West Grove, PA).

3. Preparación de fragmentos de anticuerpo

El F(ab')₂ de 3G4 se generó por incubación con pepsina proteasa. El Fab 3G4 y el Fab 7HI-1 control (antiadenovirus) se generaron por incubación con la papaína proteasa. Todos los productos de escisión de los anticuerpos se purificaron mediante FPLC y se verificaron mediante SDS-PAGE.

4. Purificación de β 2GPI de plasma humano

β 2GPI humano ($h\beta$ 2GPI) se purificó de plasma humano esencialmente como se describe anteriormente (Polz *et al.*, 1980; Wurm *et al.*, 1984). En resumen, se añadió ácido perclórico (70 %) al conjunto de plasma a una concentración final de 1,57 % (v/v). El precipitado se desechó y el sobrenadante se ajustó a un pH de 7,5 con Na₂CO₃ saturado seguido de diálisis extensiva contra Tris 50 mM, pH 8,0. Este material se aplicó a una columna de celulosa DEAE equilibrada con Tris 50 mM, pH 8,0 para retirar los contaminantes. Después se aplicó el flujo a través de la columna de DEAE a una columna de afinidad de heparina-Sepharose equilibrada con Tris 50 mM, pH 8,0, y las proteínas

unidas se eluyeron usando NaCl 1,0 M. Finalmente, la preparación de β 2GPI se dializó contra PBS y se purificó adicionalmente mediante la proteína A/G para retirar la IgG contaminante. La preparación final contenía una banda homogénea a 50 kDa, como se muestra mediante SDS/PAGE no reductora y tinción Coomassie.

5. Construcción y expresión de β 2GPI y de los dominios de β 2GPI

5 Para generar las formas de longitud completa y delecionadas recombinantes puras de β 2GPI, se usó el vector de expresión de lanzadera de levadura pPIC α A (Invitrogen) y la cepa hospedadora Mut⁺X-33 (Invitrogen). El vector de expresión contenía el promotor 5' y las secuencias de terminación de la transcripción 3' del gen de la alcohol oxidasa (metanol) (AOX1). El vector también tenía una secuencia señal del factor de acoplamiento α de levadura cadena abajo del promotor AOX1 al cual el ADNc extraño podía fusionarse para la secreción de la proteína heteróloga recombinante en el medio de cultivo. La expresión en *P. pastoris* proporciona la glucosilación y la formación de enlaces disulfuro similares a la de células de mamífero.

Para generar las construcciones de expresión se realizaron las siguientes cinco construcciones de expresión usando ADNc de β 2GPI humano:

15 (1) Toda la región codificante del ADNc de β 2GPI sin su péptido de señal afín (dominio 1-5),
Cebador 5'; S'-GGAATTCGGACGGACCTGTCCCAAGC-S' (SEC ID N°: 12);

(2) Dominio 1 delecionado (dominio 2-5),
Cebador 5'; S'-GGAATTCGTATGTCTTTTGC-S' (SEC ID N°: 13);

(3) Dominio 1 y 2 delecionado (dominio 3-5),
Cebador 5', 5'-GGAATTCGCTCCCATCATCTGC-3' (SEC ID N°: 14);

20 (4) Dominio 1-3 delecionado (dominio 4-5),
Cebador 5', 5'-GGAATTCGTAAAATGCCCATTC-3' (SEC ID N°: 15); y

(5) solo dominio 5,
Cebador 5', 5'-GGAATTCGCATCTTGTAAGTAC-3' (SEC ID N°: 16).

25 Un cebador 3' habitual, 5'-TTCTAGATTAGCATGGCTTTAC-3' (SEC ID N°: 17) se usó para la PCR de todos los fragmentos. Los fragmentos amplificados por PCR se insertaron en fase entre los sitios de restricción EcoR1 y XbaI de pPIC α A, directamente cadena abajo de la secuencia señal del factor de acoplamiento α . Se introdujo un codón de terminación en el extremo de cada fragmento para impedir la fusión de las proteínas recombinantes con un epítipo c-myc o una etiqueta de histidina en el extremo C. Las construcciones del plásmido se propagaron en *E. coli* en presencia de 100 μ g/ml de blasticidina y se verificaron mediante análisis de restricción y secuenciación de nucleótidos. Las proteínas recombinantes expresadas por las construcciones (1), (2), (3), (4) y (5) codificaban proteínas de aproximadamente 36, 29, 24, 16 y 9 kDa, respectivamente, antes de la glucosilación.

30 Para la transformación y exploración de los clones de expresión, las construcciones del plásmido recombinante se linealizaron con la enzima de restricción SacI, se purificaron, y se usaron 10 μ g para transformar la cepa hospedadora X-33 por el método con esferoplastos (Invitrogen). Los transformantes de cada una de estas construcciones se seleccionaron en placas de YPD (Medio de extracto de Levadura Peptona Dextrosa) que contenía blasticidina 400 μ g/ml durante 4 días. Diversos clones de cada una de estas construcciones se sembraron de nuevo en estrías en placas YPD con blasticidina 400 μ g/ml para determinar los integrantes verdaderos. Diez clones de cada construcción se sembraron en estrías en placas con Dextrosa Mínima (MD) y Metanol Mínimo (MM). Cinco clones de cada construcción, que se desarrollaban igualmente bien en las placas tanto MD como MM, se desarrollaron después en medio MD y MM líquido durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Los sobrenadantes y los sedimentos de cada clon en cualquier momento se analizaron mediante transferencia de Western usando el anticuerpo policlonal anti- β 2GPI humano. Los clones que mostraban la mayor expresión de la proteína en el sobrenadante se usaron adicionalmente para una preparación a gran escala.

35 Para la purificación a gran escala de las proteínas recombinantes, estas se produjeron usando condiciones de cultivo recomendadas por Invitrogen. Un cultivo iniciador de cada clon se cultivó en 5 ml de medio complejo de glicerol mínimo tamponado (BMGY) a 30 °C con agitación intensa durante una noche. Las células se recogieron, se usaron para inocular 25 ml de BMGY y se cultivaron durante 2 días. Las células del cultivo de 25 ml se usaron después para inocular 1 l de medio complejo de metanol mínimo tamponado (BMMY) (metanol al 1,0 %). El cultivo continuó durante 4 días a 30 °C con agitación intensa y se añadió metanol al 100 % cada 24 horas (concentración final de 1,0 %) para mantener la expresión de la proteína. El medio de cultivo se aclaró por centrifugación (4000 x g, 15 min) y el sobrenadante se dializó durante 2 días a 4 °C en tampón Tris 50 mM antes de aplicarse a una columna de DEAE sephacel con tampón Tris 50 mM. La solución de flujo continuo se recogió y se aplicó a una columna de heparina-sepharose. El β 2GPI se eluyó de la columna de heparina-sepharose con NaCl 1 M, se dializó frente a tampón Tris 50 mM, se concentró usando un concentrador Amicon y se analizó mediante transferencia de Western.

50 El extremo N de cada proteína se secuenció para confirmar la escisión de la secuencia líder de factor α . Los rendimientos de la proteína variaron de 10 mg/l (β 2GPI de longitud completa) a 25 mg/l (dominio V de β 2GPI).

6. Preparación de hβ2GPI “con muesca”

La hβ2GPI con muesca se preparó a partir de hβ2GPI intacta purificada de plasma humano como se ha descrito anteriormente. La hβ2GPI se incubó con perlas recubiertas con plasmina a 37 °C durante 17 horas. Las perlas se retiraron por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína escindida se recuperó. La transferencia de Western del producto purificado indicó que las preparaciones de β2GPI con muesca no contenían productos autoproteolíticos de plasmina (sin reactividad con anticuerpos antiplasmina o antiangioestatina). El análisis de secuencia N terminal reveló dos extremos N que correspondían con el extremo N de β2GPI y con una nueva secuencia generada en el sitio de escisión Lys317/Thr318.

7. ELISA anti PS

El ensayo se realizó de la siguiente manera (véase también, Ran *et al*, 2005). Placas de microtitulación Immunlon IB recubiertas con PS se bloquearon durante una noche en OVA al 1 % (p/v). Al día siguiente, se prepararon diluciones en serie con factor 2 de 3G4 purificado de sobrenadante asérico o con suero a partir de una concentración inicial de 13,33 nM. Las diluciones se realizaron en un suero no termoactivado con OVA al 1 % o al 10 % de vaca, ser humano, rata o ratón. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C y se detectó la unión de 3G4. Los estudios AUELISA se realizaron al menos tres veces.

8. ELISA anti-hβ2GPI

El ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente con las siguientes modificaciones. Se usaron hβ2GPI, hβ2GPI cortada o los péptidos hβ2GPI recombinantes para recubrir, durante una noche, placas de microtitulación de Immunlon 2HB de 96 pocillos, a una concentración de 10 µg/ml. Después, las placas se bloquearon en OVA al 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Se diluyeron 3G4, ch3G4 o anti-β2GPI en OVA al 1 % hasta una concentración inicial de 13,33 nM y se prepararon diluciones en serie de factor 2. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C y se detectó la unión del anticuerpo. Todos los estudios ELISA se realizaron al menos tres veces.

9. Transferencia de Western

Las muestras de proteína se calentaron a 95 °C durante 5 minutos en tampón de muestra SDS no reductor. Después, las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE de gradiente Tris-HCl 4-15 % y se separaron usando un aparato Mini Protean II (Biorad). Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de PVDF y se bloquearon durante una noche en BSA al 3 % (p/v). Las membranas se exploraron con anti β2GPI, 3G4 o IgG de ratón de control diluido a 1 µg/ml en BSA al 3 %, se lavaron cuidadosamente y se incubaron con anti-IgG de ratón de cabra marcado con peroxidasa. Las membranas se desarrollaron usando un kit de Sustrato Opti-4CN.

10. Inducción y detección de la exposición de PS sobre células endoteliales

Las células endoteliales aórticas bovinas adultas (ABAE) se mantuvieron en DMEM complementado con FBS al 10 % y L-glutamina 2 mM. Las células ABAE se retiraron de cultivos subconfluentes mediante una breve exposición de tripsina al 0,25%/EDTA al 0,02 %, y se sembraron portaobjetos de cámara de 8 pocillos con 2x10⁴ células/pocillo. Después de un cultivo durante una noche, las células se lavaron suavemente con PSB y se trataron con lisofosfatidilcolina (LPC) 200 µM para inducir la exposición a PS. El tratamiento con LPC se realizó en presencia de 3G4, ch3G4, o IgG de control durante 30 minutos a 37 °C en cualquiera de FBS al 10 % o suero de ratón normal al 10 % (MS). Si el tratamiento con LPC se realizaba en MS al 10 %, se añadía hβ2GPI como un cofactor porque 3G4/ch3G4 no puede unirse a PS en MS (véanse los Resultados).

La exposición de PS se determinó por tinción inmunofluorescente. Las células se lavaron cuidadosamente en PBS, se fijaron en paraformaldehído al 4 % (p/v) y se incubaron con un anticuerpo anti ratón secundario conjugado con biotina. Después, las células se incubaron con FITC-conjugado con estreptavidina (Jackson Immunoresearch) para detectar la unión del anticuerpo. Después las células se permeabilizaron con Triton-X100 al 0,1 % en PBS y se tiñeron por contraste con faloidina conjugada con Rojo Texas (Molecular Probes, Eugene, OR) y 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Molecular Probes). Se tomaron imágenes usando una cámara digital Coolsnap (Photometrics, Tucson, AZ) montada en un microscopio Nikon y se procesaron con un programa informático MetaVue (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA).

11. Cuantificación de la unión del anticuerpo a células ABAE

El área de unión del anticuerpo se determinó usando el programa informático de análisis de imagen MetaVue que puede identificar el número de píxeles iluminados en una imagen. Las imágenes de fluorescencia FITC se usaron para cuantificar la unión del anticuerpo. Se usaron imágenes correspondientes de fluorescencia DAPI para normalizar las imágenes FITC con respecto al número de células presente en el campo. Una proporción pequeña FITC/DAPI indica una pequeña área de unión al anticuerpo, mientras que una gran proporción de FITC/DAPI indica una gran área de unión. Las proporciones FITC/DAPI se usaron para determinar aumentos o disminuciones en el área de unión del anticuerpo con respecto a la cantidad basal de unión de anticuerpo en las condiciones seleccionadas. Se usaron cinco imágenes a un aumento de 200x para cada análisis. Los datos se presentan como

un promedio relativo de proporciones FITC/DAPI representando las barras de error la desviación típica.

B. Resultados

1. 3G4 requiere un factor sérico que se une a placas de microtitulación recubiertas con PS

5 El anticuerpo 3G4 purificado de medios que contenían suero (SCM) o medios aséricos (SFM) se une a placas de microtitulación cubiertas con PS cuando se realizan diluciones en serie en FBS al 10 % (FIG. 9A, líneas gruesas). Por otro lado, cuando se realizan diluciones en serie en OVA al 1 % (que carece de proteínas séricas bovinas), el 3G4 purificado de SFM ya no se une a PS (FIG. 9A, líneas discontinuas, ■). Este descubrimiento indica un factor presente en el suero bovino que mide la interacción entre 3G4 y PS.

10 Cabe destacar, que 3G4 purificado de SCM se une a PS débilmente cuando se realizan diluciones en serie en OVA al 1 % (FIG. 9A, líneas discontinuas, ▲). Esto sugiere que la purificación de 3G4 que se desarrolla en SCM no retira completamente las proteínas de suero necesarias para mediar la interacción entre 3G4 y PS. Por lo tanto, los estudios descritos posteriormente a continuación se realizaron usando 3G4 purificado de SFM.

2. La unión de 3G4 a PS en sueros de diferentes especies

15 Para determinar si los sueros de otras especies de mamífero pueden mediar la interacción entre 3G4 y PS, se realizaron diluciones en serie de 3G4 en sueros de ratón, rata, ser humano u otros al 10 %. El 3G4 se unió a PS en presencia de suero de rata y ser humano, al igual que en presencia de suero bovino (FIG. 9B). Sin embargo, 3G4 no se unió a PS en presencia de suero de ratón (FIG. 9B). En otros estudios, 3G4 se unió a PS en presencia de suero de mono, hámster, hurón, cobaya, conejo y mono. Por lo tanto, el epítipo de la proteína de suero reconocido por 3G4 se convierte entre todas las especies de mamífero ensayadas excepto en la de ratón.

20 **3. 3G4 se une a la glucoproteína de suero β2GPI**

En el último periodo de 1980, una cohorte de pacientes que padecía trombosis venosa y arterial, trombocitopenia y/o pérdida recurrente de embarazo mostró que tenía anticuerpos antifosfolípidos (aPL) en circulación (Hughes *et al*, 1986; Deleze *et al*, 1989). Se describió que estos pacientes tenían “Síndrome Antifosfolípido” (APS). A principios de los 90, se descubrió que muchos anticuerpos denominados aPL no reconocían directamente los fosfolípidos, sino que en su lugar se unían a proteínas en suero con afinidad por los fosfolípidos (Galli *et al*, 1990; McNeil *et al*, 1990). Por lo tanto, un panel de proteínas de suero humano que se sabía que interaccionaba con fosfolípidos aniónicos se exploró con respecto a la reactividad con 3G4.

25 En términos de β2GPI, el β2GPI humano (hβ2GPI) se aplicó a una placa de microtitulación y se incubó con anticuerpo anti-β2GPI humano de ratón (anti-β2GPI), 3G4, o un IgG2a de ratón de control de especificidad irrelevante (mIgG de control). Como se esperaba, el anti-β2GPI se unió a hβ2GPI, mientras que el mIgG de control no lo hizo (FIG. 10A). 3G4 también se unió fuertemente a la placa recubierta con hβ2GPI (FIG. 10A).

30 Para determinar si β2GPI es la única proteína de suero reconocida por 3G4, el hβ2GPI purificado y el suero humano al 10 % se procesaron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a un soporte de membrana para una inmunotransferencia. El 3G4 detectó el hβ2GPI purificado de 50 kDa y una sola banda de tamaño similar en suero humano. Cabe destacar que la inmunotransferencia de 3G4 era prácticamente idéntica a una transferencia generada usando el anticuerpo anti-β2GPI. El anticuerpo mIgG control no detectó ninguna proteína. En su conjunto, estos datos indican que 3G4 se une a la proteína de suero β2GPI.

35 Otras proteínas en suero humanas que se sabe que interaccionan con fosfolípidos aniónicos se ensayaron con respecto a la reactividad con 3G4 en ELISA. Se recubrieron placas de microtitulación con las mismas cantidades de la proteína particular, se bloquearon en OVA al 1 % y se incubaron con una dilución en serie de 3G4. Las placas se lavaron cuidadosamente y se detectó la unión del anticuerpo con un anticuerpo de detección secundario marcador con peroxidasa. Todos los estudios incluyeron anticuerpos de control positivos y negativos, que funcionaron como se esperaba. Los resultados de los estudios de inmunotransferencia y ELISA se muestran en la Tabla 15, que identifica de esta manera β2GPI como el factor de unión conjunta para 3G4.

45

TABLA 15

Reactividad de 3G4 con proteínas de suero que interaccionan con fosfolípidos

Proteína de suero	Reactividad de 3G4
anexina V	-
beta2-glucoproteína I	+
factor XII	-
quininógeno	-

LDL oxidada	-
proteína C	-
proteína S	-
protrombina	-
tPA	-

4. 3G4 se une a β 2GPI en el dominio II

5 β 2GPI tiene cinco dominios, de los cuales el quinto dominio es responsable de la unión a fosfolípidos aniónicos. Para determinar qué dominio de β 2GPI reconoce el anticuerpo 3G4, se generaron construcciones β 2GPI humanas recombinantes con diferentes estructuras de dominio y se ensayaron junto con el h β 2GPI recombinante de longitud completa. Estas construcciones de dominio se realizaron mediante truncamientos en serie desde el extremo N, y por lo tanto carecen de cada uno de los dominios N terminal sucesivamente, de la siguiente manera: h β 2GPI de longitud completa contiene los dominios I-V; h β 2GPI a partir del cual el dominio I se ha delecionado contiene los dominios II-V; h β 2GPI a partir del cual los dominios I y II se han delecionado contienen los dominios III-V; h β 2GPI a partir del cual se han delecionado los dominios I, II y III contiene los dominios IV-V y h β 2GPI a partir del cual se han delecionado los dominios I, II, III y IV contiene solo el dominio V.

10 Se recubrieron placas de microtitulación con las mismas cantidades de h β 2GPI de longitud completa y cada una de las construcciones del dominio h β 2GPI anterior y se incubaron con una dilución en serie de 3G4. Este estudio mostró que únicamente las construcciones h β 2GPI que contienen el dominio II de β 2GPI (dominios I-V y dominios II-V) se detectaban mediante 3G4 (FIG. 10B). Cuando el dominio I se delecionó, 3G4 se unía igualmente bien a los dominios II-V (FIG. 10B). Por tanto, 3G4 se une a β 2GPI en el dominio II.

15 El hallazgo de 3G4 se une al dominio II de β 2GPI es importante a la luz de la información conocida sobre anticuerpos patógenos aislados de pacientes con APS. Los anticuerpos anti- β 2GPI patógenos aislados de pacientes con APS normalmente reconocen el dominio I de β 2GPI (de Laa *et al.*, 2005a). Los anticuerpos anti- β 2GPI de pacientes con APS que reconocen el dominio II no son a menudo patógenos. Esto explica posiblemente la ausencia de toxicidad asociada con 3G4 después de estudios toxicológicos ampliados realizados en diversos modelos animales.

5. Unión simultánea de 3G4 y β 2GPI a células con PS expuesto

25 La caracterización de la unión de anticuerpo anti- β 2GPI usando placas de microtitulación cubiertas con β 2GPI ha sido controvertida debido a incoherencias observadas dependiendo del tipo o incluso del lote de la placa de microtitulación (de Laa *et al.*, 2004a). Para verificar los hallazgos anteriores en condiciones más fisiológicas, se desarrolló un ensayo de unión de células vivas. Este ensayo detecta y mide la unión del anticuerpo a superficies de la membrana de células endoteliales después de tratamiento con el agente alterador de membrana, la lisofosfatidilcolina (LPC) que induce la exposición a PS.

30 En este ensayo se incubaron células ABAE con 3G4 o mIgG control en DMEM + FBS al 10 % en presencia o en ausencia de LPC 200 μ M durante 30 minutos. Después las células se lavaron, se fijaron y se tiñeron con marcadores fluorescentes para visualizar la unión del anticuerpo a la superficie celular. El área de píxeles de 3G4 o unión de mIgG se cuantificó usando un programa informático MetaVue. Todos los valores eran relativos a la unión de 3G4 a células no tratadas con LPC, que se estableció en uno.

35 Cuando se añadió 3G4 al medio de cultivo de células ABAE en condiciones normales, no se observaba la unión a las células. Sin embargo, cuando las células ABAE se incubaban con 3G4 en presencia de LPC, eran detectables fácilmente numerosos puntos de unión de 3G4. Se sabe que LPC induce distorsiones de la membrana temporales (Kogure *et al.*, 2003), que probablemente producen una pérdida de asimetría de membrana y exposición de PS.

40 La cuantificación mostró que el área de unión de 3G4 aumentaba más de 500 veces después de tratamiento con LPC, mientras que la unión de un mIgG control permanecía indetectable. Se obtuvieron previamente resultados similares cuando se observaba que 3G4 y la molécula de unión a PS anexina V se unía a células endoteliales después de inducción de exposición de PS con H₂O₂ (Ejemplo VI; Ejemplo VII; véase también, Ran *et al.*, 2005).

45 Cabe destacar que las células ABAE tratadas con LPC no se teñían por los colorantes impermeables a membrana yoduro de propidio o DAPI, indicando que 3G4 se une a PS en la membrana celular, no en la cara interna de la membrana plasmática.

Para determinar si β 2GPI se requiere para la unión de 3G4 a células endoteliales con PS expuesta, se realizó un ensayo de unión a células vivas en medios que contenían MS al 10 % en lugar de FBS al 10 % para impedir la interferencia de β 2GPI bovino. Como se demuestra anteriormente, 3G4 no se une a PS en presencia de MS.

Además, 3G4 no detecta ninguna proteína MS al 10 % por inmunotransferencia, indicando que 3G4 no reconoce la β 2GPI murina.

5 Para este estudio, se usó 3G4 quimérico humano (ch3G4) para impedir el fondo causado por la detección de la IgG murina presente en MS. Cuando las células ABAE se incubaron con ch3G4 en presencia de MS al 10 % y LPC, no se detectó ninguna unión a anticuerpo (FIG. 11). Sin embargo, la adición de H β 2GPI purificado en la reacción de unión confirmó la unión dispersa de ch3G4 (FIG. 11), demostrando que la unión de ch3G4 es dependiente de h β 2GPI. En todas las situaciones, la unión de ch3G4 era dependiente de tratamiento con LPC y no se detectó ninguna unión usando una IgG humana de control de especificidad irrelevante.

10 Cabe destacar que cuando las células ABAE se incubaron con h β 2GPI en presencia de MS al 10 % y LPC, se lavaron cuidadosamente y después se incubaron con ch3G4 para detectar la unión de h β 2GPI, se detectó muy poca cantidad de unión a ch3G4 (FIG. 11). Este hallazgo indica que h β 2GPI no se une a células endoteliales con PS expuesta en ausencia de ch3G4 y es coherente con los informes de que β 2GPI tiene una baja afinidad por las superficies de la membrana fosfolipídica aniónica en condiciones fisiológicas (Willems *et al.*, 1996; Bevers *et al.*, 2005). En su conjunto, estos datos muestran que ch3G4 y h β 2GPI deben estar presentes simultáneamente para
15 unirse a células ABAE con PS expuesta, lo que sugiere que ch3G4 potencia la afinidad de β 2GPI por las superficies fosfolipídicas aniónicas.

6. La región de unión a lípidos de β 2GPI se requiere para la unión conjunta de 3G4

20 Para confirmar que la región de unión a lípidos de β 2GPI se requiere para la unión conjunta de β 2GPI y 3G4 (y ch3G4) a células endoteliales con PS expuesta y otros fosfolípidos aniónicos, se realizó el ensayo de unión con células vivas usando h β 2GPI "con muesca". La h β 2GPI con muesca es incapaz de unirse a PS y a otros fosfolípidos aniónicos debido a la escisión mediada por plasmina dentro de la región de unión a lípido del dominio V (Hunt *et al.*, 1993; Hunt y Krilis, 1994).

25 Cuando células ABAE se incuban con ch3G4 y h β 2GPI o h β 2GPI con muesca en ausencia de LPC, no se detecta unión a ch3G4 (FIG. 12A). En presencia de LPC, h β 2GPI puede mediar en la unión de ch3G4 a células ABAE con PS expuesta, aunque h β 2GPI con muesca no es capaz de mediar en la unión (FIG. 12A). La ausencia de unión en el ensayo de células vivas no se debe a una incapacidad de ch3G4 a unirse a h β 2GPI con muesca, dado que ch3G4 se une a h β 2GPI con muesca así como a h β 2GPI cuando se recubren placas de microtitulación con iguales cantidades de proteína (FIG. 12B). Estos hallazgos demuestran que el complejo ch3G4/h β 2GPI detecta PS y otros fosfolípidos aniónicos expuestos en células ABAE después del tratamiento con LPC a través de la región de unión a
30 lípidos del dominio V de h β 2GPI.

7. La divalencia del anticuerpo se requiere para la unión conjunta de β 2GPI

Los datos presentados anteriormente sugieren que 3G4 detecta PS y fosfolípidos aniónicos potenciando la afinidad de β 2GPI por fosfolípidos aniónicos. Cabe destacar que se sabe que los anticuerpos anti- β 2GPI aislados de muchos pacientes con APS aumentan la afinidad de β 2GPI por superficies fosfolipídicas aniónicas (Bevers *et al.*, 2004).
35 Además, el fenómeno es dependiente de la formación de un complejo divalente anticuerpo- β 2GPI.

Para determinar si la divalencia se requiere para la unión de complejos 3G4/ β 2GPI a PS y a fosfolípidos aniónicos, células ABAE tratadas con LPC se incubaron con h β 2GPI purificado y diversas cantidades de ch3G4. El área de unión de ch3G4 aumentó de una manera dependiente de la concentración a un pico en una proporción de anticuerpo con respecto a β 2GPI de 2:1 (FIG. 13). Aumentos adicionales en la concentración de ch3C4 causaron una
40 disminución dependiente de la concentración en la unión. La relación en forma de campana entre la concentración de ch3G4 y la unión a células endoteliales con PS expuesto sugiere la formación de complejos ch3G4/ β 2GPI divalentes sobre la superficie de la membrana. A una concentración muy alta de anticuerpo, la competición entre los complejos monovalentes y divalentes causa una disminución en la cantidad de complejo ch3G4/ β 2GPI unida a células ABAE tratadas con LPC.

45 Para examinar adicionalmente si la divalencia se requiere para la unión a células endoteliales con PS expuesta, se generaron monómeros 3G4 F(ab')₂ y 3G4 Fab' y se usaron en ensayos de unión con células vivas con 3G4 intacto. Como se esperaba, el 3G4 intacto se unía a células ABAE tratadas con LPC, pero no a células no tratadas (FIG. 14A). Una concentración equivalente de F(ab')₂ de 3G4 también se unía a células ABAE tratadas con LPC. Pero la unión de Fab' 3G4 era insignificante (FIG. 14A). La disminución aparente en la unión de F(ab')₂ de 3G4 con respecto a 3G4 (FIG. 14A) se debe probablemente a la pérdida de unión del anticuerpo secundario policlonal a epítopos Fc ausentes en F(ab')₂ 3G4. No se detectó unión de Fab' 3G4 en células ABAE incluso a una concentración de 2 μ M (FIG. 14B), que es 1.000 veces por encima de la concentración necesaria para unirse a β 2GPI que recubre placas de microtitulación.
50

Además, Fab' 3G4 inhibió la unión de ch3G4/ β 2GPI a células ABAE tratadas con LPC de una manera dependiente de la concentración (FIG. 14C), aunque un Fab' de control de especificidad irrelevante no lo hizo. La capacidad de Fab' 3G4 para inhibir la unión a ch3G4 confirma que Fab' 3G4 es capaz de unirse a β 2GPI y que los complejos
55

monoméricos 3G4 Fab'/ β 2GPI no pueden unir células endoteliales con PS expuesta. Estos datos confirman la hipótesis de que los complejos divalentes 3G4/ β 2GPI se requieren para unirse a superficies de fosfolípidos aniónicos.

5 Como se muestra en la FIG. 10B, el anticuerpo 3G4 se une a β 2GPI en el dominio II, y como se muestra en la FIG. 12A y FIG. 12B, la región de unión a lípido del dominio V de β 2GPI se requiere para la unión conjunta de 3G4 (y ch3G4) y β 2GPI a PS expuesta en células endoteliales. Además, como se demuestra en el presente documento, se requiere la divalencia del anticuerpo para la unión conjunta de 3G4 (y ch3G4) y β 2GPI a PS expuesta. Por consiguiente, los autores de la invención han presentado un modelo de anticuerpo y de unión conjunta de β 2GPI a PS expuesta sobre la superficie externa de las membranas, tal como ocurre en células endoteliales activadas, células endoteliales vasculares tumorales y células tumorales, así como en células infectadas con virus (FIG. 15).

Ejemplo XXXI

Preparación y caracterización de un Fc- β 2GPI

15 Este ejemplo se refiere a la preparación y caracterización de una construcción ejemplar de Fc- β 2GPI. En esta construcción, la región Fc de la IgG_{2a} de ratón se unió a β 2GPI de ratón de longitud completa (dominios I-V) para crear el Fc- β 2GPI murino o Fc-m β 2GPI. La IgG_{2a} Fc de ratón se usó tanto como un dominio de dimerización como para proporcionar funciones efectoras. La construcción Fc- β 2GPI dimerica resultante tiene varios usos, incluyendo el direccionamiento de vasos sanguíneos tumorales y de células infectadas con virus, cada una de las cuales tiene expuestas PS. Una ventaja de usar una región Fc es que la construcción Fc- β 2GPI puede marcar las células dirigidas para el ataque del sistema inmunitario hospedador.

20 A. Preparación

Aunque se han diseñado diversas construcciones de Fc- β 2GPI, la construcción Fc- β 2GPI (Fc-m β 2GPI) ejemplar del presente ejemplo usa una región Fc murina como un extremo N y dominios I-V de β 2GPI murina como el extremo C. Por tanto la Fc- β 2GPI contiene la región bisagra unida por disulfuro y dos dominios C_{H2} y C_{H3} de la región Fc de la IgG_{2a} de ratón con el extremo C terminal de cada dominio C_{H3} ligado al extremo N de dos proteínas β 2GPI de ratón de longitud completa (FIG. 16).

25 Para preparar un plásmido de expresión, la secuencia señal de la cadena ligera de 3G4 se amplificó por PCR a partir de la construcción 2aG4; una región Fc de IgG_{2a} de ratón que contiene los dominios bisagra, C_{H2} y C_{H3} se amplificó por PCR a partir de la construcción 2aG4; y la β 2GPI de ratón se amplificó por RT-PCR de ARN de hígado de ratón obtenido en el mercado. La secuencia de la proteína resultante Fc-m β 2GPI se muestra en la FIG. 18A. La secuencia señal mIgG_k (SEC ID N°: 18) se escinde, dejando la Fc-m β 2GPI madura como SEC ID N°: 19 (FIG. 18A).

30 El mapa del plásmido se muestra en la FIG. 17 y la secuencia total del plásmido se proporciona como SEC ID N°: 25. La construcción Fc-m β 2GPI se transfirió a células CHO con el reactivo FuGENE 6. Dos días después, se recogió el sobrenadante y se usó en diversos ensayos.

35 Puede prepararse un Fc- β 2GPI humano (Fc-h β 2GPI) homólogo usando la información de secuencia en la FIG. 18B, que proporciona una secuencia de aminoácidos ejemplar para una región constante de cadena pesada de IgG₁ humana (número de Registro P01857; SEC ID N°: 21) y toda la secuencia de la β 2GPI humana (número de Registro 1C1ZA; SEC ID N°: 22), incluyendo la localización de los dominios I, II, III, IV y V. Los dominios bisagra, C_{H2} y C_{H3} humanos podrían unirse a los dominios I, II, III, IV y V de la β 2GPI humana para proporcionar la Fc- β 2GPI de la SEC ID N°: 23.

40 B. Fc-m β 2GPI es un dímero

El sistema seleccionado fue eficaz para expresar Fc-m β 2GPI. La FIG. 19 muestra los resultados de un ensayo de captura usando dos clones diferentes de Fc-m β 2GPI (n° 8 y n° 18), en el que los sobrenadantes del cultivo celular Fc-m β 2GPI se unen a una IgG anti ratón.

45 Las muestras de la proteína Fc-m β 2GPI se sometieron a electroforesis en gel. En condiciones de gel no reductoras, se detectó una banda del tamaño esperado para un dímero (peso molecular aparente en el gel de 150 kDa). En condiciones reductoras, se detectan bandas de un tamaño más pequeño (Pm aparente en el gel ~90-100 kDa).

C. Fc-m β 2GPI se une a PS y a células con PS expuesta

50 Fc-m β 2GPI puede unirse a PS en placas recubiertas con PS. Usando una placa de microtitulación recubierta con PS, se determinó que los sobrenadantes del cultivo celular Fc-m β 2GPI (n° 8 y n° 18) se unían a PS de una manera dependiente de la concentración (FIG. 20).

En común con el anticuerpo 3G4 y la versión quimérica (ch3G4 o bavituximab), la unión de Fc-m β 2GPI no está

limitada a PS, sino que se amplía a otros fosfolípidos aniónicos. Los resultados de los ensayos de unión a fosfolípidos (en FBS al 10 %) muestran que los sobrenadantes de cultivo celular Fc-m β 2GPI se unen a los fosfolípidos aniónicos PS, PA, PI y PG, pero no a los lípidos neutros PC y SM.

5 Fc-m β 2GPI también puede unirse a PS expuesta en la superficie celular. Las células que experimentan apoptosis se exponen a PS en la superficie externa. En estudios usando células ABAE, que experimentan apoptosis, se descubrió que Fc-m β 2GPI teñía las células apoptóticas (FIG. 22A, FIG. 22B y FIG. 22C). Las flechas destacan células apoptóticas, que se encuentran y tienen núcleos densos.

10 Las células también pueden inducirse para presentar PS en la superficie celular sin experimentar apoptosis. Cuando las células ABAE se incuban en presencia de LPC, se produce una distorsión de membrana temporal, causando una pérdida de asimetría de la membrana y exposición a PS. Usando células ABAE tratadas con LPC, se descubrió que Fc-m β 2GPI también se unía a PS expuesta en la superficie celular, observado como pequeños puntos de tinción verde (FIG. 23A y FIG. 23B). No se observó tinción puntual en células no tratadas con LPC o usando sobrenadante de control.

Ejemplo XXXII

15 β 2GPI dimérico se une a células endoteliales con PS expuesta

Siguiendo los resultados descritos en el Ejemplo XXX y para validar adicionalmente la información expuesta en el Ejemplo XXXI, el presente ejemplo proporciona datos para mostrar que el β 2GPI dimérico se une a células endoteliales con PS expuesta en ausencia del anticuerpo 3G4.

20 En estos estudios, se usó un dímero artificial β 2GPI, que se generó fusionando h β 2GPI con el extremo C del dominio de dimerización 4 de manzana del factor XI (Lutters *et al*, 2001). Este β 2GPI no tiene las ventajas proporcionadas por la unión a una región Fc, como se describe anteriormente en la presente solicitud. Sin embargo, la unión de este dímero con células con PS expuesta valida el uso de los dímeros Fc- β 2GPI para unirse a células PS positivas.

25 Las células ABAE se trataron con LPC para inducir la exposición a PS y se incubaron con h β 2GPI purificado, dímero h β 2GPI o un dímero h β 2GPI mutante que contenía un dominio de unión a lípidos alterado. Como se esperaba, la unión de h β 2GPI monomérico a células ABAE tratadas con LPC fue insignificante (FIG. 24A). Por otro lado, el dímero h β 2GPI se unía fuertemente a células tratadas con LPC (FIG. 24B), pero no a células tratadas con LPC (FIG. 24D). También se observó que la unión del dímero h β 2GPI era dependiente después de un dominio de unión lipídico funcional (FIG. 24C). Estos datos indican que las construcciones β 2GPI divalentes se unen a células con PS expuesta.

30 Los dímeros Fc- β 2GPI de la presente invención también pueden unirse a células con PS expuesta, tales como células endoteliales vasculares tumorales, células tumorales, células infectadas con virus y partículas víricas. Sin embargo, las construcciones Fc- β 2GPI tendrán la ventaja adicional de que la región Fc promoverá funciones efectoras hospedadoras para potenciar el tratamiento de la enfermedad. Agentes adicionales también pueden unirse a las construcciones Fc- β 2GPI tales como toxinas, citocinas, radioisótopos, fármacos y similares, para proporcionar una carga terapéutica contra células diana positivas a PS.

35 Todas las composiciones y métodos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden fabricarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y métodos de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será obvio para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas en el método descrito en el presente documento sin alejarse del alcance de la invención. Más específicamente, será obvio que determinados agentes que están tanto químicamente como fisiológicamente relacionados pueden sustituir los agentes descritos en el presente documento al mismo tiempo que se consiguen los mismos o similares resultados. Se considera que todos dichos sustitutos similares y modificaciones obvios para los expertos en la técnica se encuentran dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REFERENCIAS

Las siguientes referencias, en la medida en que proporcionan ejemplos de procedimientos u otros detalles suplementarios a los establecidos en este documento, se identifican específicamente.

- 5 Abrams y Oldham, In: *Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer*, Foon and Morgan (Eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, págs. 103-120, 1985.
- Adler, Ng, Rote, "Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR," *Biol. Reprod.*, 53(4):905-910, 1995.
- Alving, Banerji, Fogler y Alving, "Lupus anticoagulant activities of murine monoclonal antibodies to liposomal phosphatidylinositol phosphate", *Clin. Exp. Immunol.*, 69:403- 408, 1987.
- 10 Anderson, Croyle, Lingrel, "Primary structure of a gene encoding rat T-kininogen," *Gene*, 81 (1):119:28, 1989.
- Andree, Reutelingsperger, Hauptmann, Hemker, Hermens, Willems, "Binding of vascular anticoagulant α (VAC α) to planar phospholipid bilayers," *J. Biol. Chem.*, 265:4923-4928, 1990.
- Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- 15 Aoki, Uenaka, Aoki, Umeda y Inoue, "A novel peptide probe for studying the transbilayer movement of phosphatidylethanolamine," *J. Biochem.*, 116:291-297, 1994.
- Asano, Yukita, Matsumoto, Kondo, Suzuki, "Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor," *Cancer Res.*, 55:5296-5301, 1995.
- Baca et al., "Antibody humanization using monovalent phage display," *J. Biol. Chem.*, 272(16): 10678-84, 1997.
- 20 Balasubramanian, Chandra, Schroit, "Immune clearance of phosphatidylserine- expressing cells by phagocytes: the role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition," *J. Biol. Chem.*, 272:31113-17, 1997a.
- Balasubramanian, Chandra, Schroit, "Macrophage recognition of phosphatidylserine- expressing cells: the role of beta(2)-glycoprotein I in immune clearance," *Blood*, 90:2864, 1997b.
- 25 Balasubramanian, Schroit, "Characterization of phosphatidylserine-dependent beta(2)- glycoprotein I macrophage interactions - implications for apoptotic cell clearance by phagocytes," *J. Biol. Chem.*, 273:29272-77, 1998.
- Balasubramanian y Schroit, "Aminophospholipid asymmetry: a matter of life and death," *Annu. Rev. Physiol*, 65:701-734, 2003.
- 30 Balasubramanian, Maiti, Schroit, "Recruitment of beta-2-glycoprotein 1 to cell surfaces in extrinsic and intrinsic apoptosis," *Apoptosis*, 10:439-446, 2005.
- Barbas, Kang, Lemer, Benkovic, "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site," *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88(18):7978-7982, 1991.
- Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88:4457-4461, 1992.
- 35 Barras, Bain, Hoekstra y Lemer, "Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4457-4461, 1992.
- Beck, Luster, Miller, "Combination of a monoclonal anti-phosphatidylserine antibody with gemcitabine strongly inhibits the growth and metastasis of orthotopic pancreatic tumors in mice," *Int. J. Cancer*, published online: 13 Dec 2005, DOI: 10.1002/ijc.21684, to be published in volume 118, edition 10, 2006.
- 40 Berman, Mellis, Pollock, Smith, Suh, Heinke, Kowal, Surti, Chess, Cantor, *et al.*, "Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus," *EMBOJ.*, 7(3):727-738, 1988.
- Bernier y Jolles, "Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein from bovine brain," *Biochim. Biophys. Acta*, 790(2):174-181, 1984.
- Bernier, Tresca, Jolles, "Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol," *Biochim. Biophys. Acta*, 871(1): 19-23, 1986.
- 45 Bevers, Rosing, Zwaal, "Development of procoagulant binding sites on the platelet surface," *Adv. Exp. Med. Biol.*, 192:359-371, 1985.

- Bevers, Zwaal, Willems, "The effect of phospholipids on the formation of immune complexes between autoantibodies and beta(2)-glycoprotein I or prothrombin," *Clin. Immunol*, 112:150-160, 2004.
- Bevers, Janssen, Comfurius, *et al.*, "Quantitative determination of the binding of beta(2)- glycoprotein I and prothrombin to phosphatidylserine-exposing blood platelets," *Biochem. J.*, 386:271-279, 2005.
- 5 Bevilacqua, "Endothelial-leukocyte adhesion molecules," *Ann. Rev. Immunol*, 11:767-804, 1993.
- Bitbol, Fellmann, Zachowski, Devaux, "Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes," *Biochim. Biophys. Acta*, 904(2):268-282, 1987.
- Blackwood y Ernst, "Characterization of Ca2(+)-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins," *Biochem. J.*, 266(1): 195-200, 1990.
- 10 Blankenberg, Katsikis, Tait, Davis, Naumovski, Ohtsuki, Kapiwoda, Abrams, Darkes, Robbins, Maecker, Strauss, "In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death," *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95(11):6349-6354, 1998.
- Bocci, "Efficient labeling of serum proteins with 131I using chloramine T," *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 15:449-456, 1964.
- 15 Bombeli, Karsan, Tait, Harlan, "Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant," *Blood*, 89(7):2429-2442, 1997.
- Borgstrom *et al.*, "Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti- vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy," *Cancer Res.*, 56(17):4032-1439, 1996.
- 20 Borgstrom *et al.*, "Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors *in vivo* " *Prostate*, 35(1):1-10, 1998.
- Bomstein, "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.
- 25 Boustead, Brown, Walker, "Isolation, characterization and localization of annexin V from chicken liver," *Biochem. J.*, 291:601-608, 1993.
- Boyle, Pohlman, Cornejo, Verrier, "Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion," *Ann. Thor. Surg.*, 62(6): 1868-1875, 1996.
- 30 Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, 72:248-254, 1976.
- Branch, Rote, Dostal, Scott, "Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine," *Clin. Immun. Immunopathol.*, 42:63-75, 1987.
- Breier, Blum, Peli, Groot, M., Wild, Risau, Reichmann, "Transforming growth factor-B and RAS regulate the VEGF/VEGF-Receptor system during tumor angiogenesis," *Int. J. Cancer*, 97:142-148, 2002.
- 35 Brem, "Angiogenesis antagonists: current clinical trials," *Angiogenesis*, 2:9-20, 1998.
- Bresnahan, Boldogh, Thompson, y Albrecht, "Human Cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1", *Virology*, 224:150-160, 1996.
- Bruggemann, Williams, Bindon, Clark, Walker, Jefferis, Waldmann, Neuberger, "Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies," *J. Exp. Med.*, 166:1351-1361, 1987.
- 40 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 *et al.*, "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors", *Science*, 236,806-812, 1987.
- 45 Burrows, Watanabe, Thorpe, "A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors," *Cancer Res.*, 52:5954-5962, 1992.
- Burrows y Thorpe, "Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8996-9000, 1993.

- Calderon y DeVries, "Lipid composition and phospholipid asymmetry of membranes from a schwann cell line," *J. Neuro. Res.*, 49:372-380, 1997.
- Callahan *et al.*, *J. Immunol.*, 170:4840-4845, 2003
- 5 Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam, págs. 75-83, 1984.
- Camemolla *et al.*, "A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors," *J. Cell Biol.*, 108:1139-1148, 1989.
- 10 Chen, Stone, Woon *et al.*, "Antiphospholipid antibodies bind to activated but not resting endothelial cells: is an independent triggering event required to induce antiphospholipid antibody-mediated disease?" *Thrombosis Res.*, 114:101-111, 2004.
- Cheng, Huang, Nagane, Ji, Wang, Shih, Arap, Huang, Cavenee, "Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:8502-8507, 1996.
- 15 Chonn, Semple, Cullis, "Beta 2 glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes *in vivo*, suggesting a significant role in the immune clearance of 'non-self particles," *J. Biol. Chem.*, 270:25845-49, 1995.
- Choung, Kobayashi, Inoue, Takemoto, Ishitsuka and Inoue, "Hemolytic activity of a cyclic peptide Ro09-0198 isolated from *Streptovorticillium*," *Biochim. Biophys. Acta.*, 940:171-179, 1988a.
- Choung, Kobayashi, Takemoto, Ishitsuka and Inoue, "Interaction of a cyclic peptide, Ro09- 0198, with phosphatidylethanolamine in liposomal membranes," *Biochem. Biophys. Acta*, 940:180-187, 1988b.
- 20 Christiansen, Sims, Hamilton, "Complement C5b-9 increases plasminogen binding and activation on human endothelial cells," *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol*, 17(1):164-171, 1997.
- Clapp *et al.*, "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis," *Endocrinology*, 133(3):1292-1299, 1993.
- Clark, "Antibody Engineering IgG Effector Mechanisms," *Chemical Immunology*, 65:88-110, 1997.
- 25 Cleve, Rittner, "Further family studies on the genetic control of beta 2-glycoprotein I concentration in human serum," *Humangenetik*, 7:93-97, 1969.
- Comfurius, Senden, Tilly, *et al.*, "Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase," *Biochim. Biophys. Acta.*, 1026(2):153-160, 1990.
- 30 Contreras, Villar, Alonso, Kolesnick, y Goni, "Sphingomyelinase activity causes transbilayer lipid translocation in model and cell membranes," *J. Biol. Chem.*, 278:37169-37174, 2003.
- Coughlin *et al.*, "Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis," *J. Clin. Invest.*, 101(6):1441-1452, 1998.
- D'Amato *et al.*, "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9):4082-4085, 1994.
- 35 D'Angelo *et al.*, "Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N- terminal fragment of prolactin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(14):6374-6378, 1995.
- Dachary-Prigent, Toti, Satta, Pasquet, Uzan, Freyssinet, "Physiopathological significance of catalytic phospholipids in the generation of thrombin," *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 22:157-164, 1996.
- 40 Daleke, "Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry," *J. Lipid Res.*, 44:233-242, 2003.
- Daum, "Lipids of mitochondria," *Biochim. Biophys. Acta*, 822(1):1-42, 1985.
- Davis y Yancopoulos, "The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 237:173-85, 1999.
- 45 Demo, Masuda, Rossi, *et al.*, "Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytometric annexin-V binding assay," *Cytometry*, 36(4):340-348, 1999.
- de Laat, Derksen, de Groot, "beta(2)-glycoprotein I, the playmaker of the antiphospholipid syndrome," *Clin. Immunol.*, 112:161-168, 2004a.

- de Laat, Derksen, Urbanus, Roest, de Groot, "beta(2)-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome," *Blood*, 104:3598-3602, 2004b.
- de Laat, Derksen, Urbanus, de Groot, "IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta(2)-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis," *Blood*, 105:1540-1545, 2005a.
- 5 de Laat, Derksen, van Lummel, Pennings, de Groot, "Pathogenic anti-beta(2)-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta(2)-glycoprotein I only after a conformational change," *Blood*, published online: DOI 10.1182/blood-2005-05-1943, 2005b.
- Deleze, Alarconsegovia, Valdesmacho, Oria, Deleon, "Relationship between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in patients with systemic lupus-erythematosus and apparently healthy women, J". *Rheumatol.*, 16:768-772, 1989.
- 10 Denekamp, "Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer," *Cancer Metastasis Rev.*, 9:267-282, 1990.
- Devaux, "Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21:417-439, 1992.
- Devitt, Pierce, Oldreive, Shingler, Gregory, "CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine," *Cell Death Differ.*, 10:371-382, 2003.
- 15 DeVore *et al.*, "Phase I study of the antineovascularization drug CM101," *Clin. Cancer Res.*, 3(3):365-372, 1997.
- Diehl, Pfreundschuh, Fonatsch, Stein, Falk, Burrichter, Schaadt, "Phenotypic genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications," *Cancer Surveys*, 4:399-416, 1985,
- 20 Dillon, Mancini, Rosen, *et al.*, "Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation," *J. Immunol.*, 164(3):1322-1332, 2000.
- Donati y Falanga, "Pathogenic mechanisms of thrombosis in malignancy," *Acta Haematol.*, 106(1-2):18-24, 2001.
- Drouvalakis 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.
- 25 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.
- 30 Emoto, Kobayashi, Yamaji, Aizawa, Yahara, Inoue y Umeda, "Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:12867-12872, 1996.
- Emoto, Toyama-Sorimachi, Karasuyama, Inoue y Umeda, "Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells," *Exp. Cell Res.*, 232:430-434, 1997.
- 35 Fadok, Bratton, Konowal, Freed, Westcott, Henson, "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF," *J. Clin. Invest.*, 101:890-898, 1998.
- Fadok, Bratton, Rose, Pearson, Ezekewitz, Henson, "A receptor for phosphatidylserinespecific clearance of apoptotic cells," *Nature*, 405:85-90, 2000.
- 40 Fadok, de Cathelineau, Daleke, Henson, Bratton, "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by microphages and fibroblasts," *J. Biol. Chem.*, 276:1071-1077, 2001a.
- Fadok, Bratton, Guthrie, Henson, "Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases," *J. Immunol.*, 166:6847-6854, 2001b.
- 45 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.
- Folkman *et al.*, "Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone," *Science*, 221:719-725, 1983.

- Fotsis *et al.*, "The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth," *Nature*, 368(6468):237-239, 1994.
- Frankel, "Genetically Engineered Toxins", Editor Arthur E. Frankel, Marcel Dekker Inc., New York, NY, 1992.
- 5 Frater-Schroder *et al.*, "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth *in vitro*, is angiogenic *in vivo*," *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 84(15):5277-5281, 1987.
- Frazier, "Thrombospondins," *Curr. Opin. Cell Biol*, 3(5):792-799, 1991.
- Fridriksson, Shipkiva, Sheets, Holowka, Baird y McLafferty, "Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry:," *Biochemistry*, 38: 8056-8063, 1999.
- 10 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, Bienvénie, "Transverse redistribution of phospholipids during human platelet activation: evidence for a vectorial outflux specific to aminophospholipids," *Biochem.*, 34:6762-6769, 1995.
- Gagliardi, Hadd, Collins, "Inhibition of angiogenesis by suramin," *Cancer Res.*, 52(18):5073-5075, 1992.
- 15 Gagliardi y Collins, "Inhibition of angiogenesis by antiestrogens," *Cancer Res.*, 53(3):533- 535, 1993.
- Gagliardi *et al.*, "Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues," *Cancer Chemother. Pharmacol*, 41(2):117-124, 1998.
- Galli, Comfurius, Maassen Hemker, de Baets, van Breda-Vriesman, Barbui, Zwaal, Bevers, "Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor," *Lancet*, 335(8705): 1544-1547, 1990.
- 20 Galli, Barbui, Zwaal, Comfurius, Bevers, "Antiphospholipid antibodies: involvement of protein cofactors," *Haematologica*, 78(1):1-4, 1993.
- Gallucci y Matzinger, "Danger signals: SOS to the immune system," *Curr. Opin. Immunol.*, 13:114-119, 2001.
- Gavrieli, Sherman, Ben-Sasson, "Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation," *J. Cell Biol.*, 119(3):493-501, 1992.
- 25 Gefter *etal.*, "A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells," *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.
- Giovarelli *et al.*, "Tumor rejection and immune memory elicited by locally released LEC chemokine are associated with an impressive recruitment of APCs, lymphocytes, and granulocytes", *J. Immunol.*, 164, 3200-3206, 2000.
- Goding, *In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2nd Edition*, Academic Press, Orlando, FL., págs. 60-61,65-66, 71-74, 1986.
- 30 Good *et al.*, "A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(17):6624-6628, 1990.
- Graham, *et al.*, "Primary respiratory syncytial virus infection in mice," *J. Med. Virol*, 26(2): 153-62, 1988.
- 35 Grant *et al.*, "Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration," *Diabetes*, 47(8): 1335-1340, 1998.
- Hammill, Uhr, Scheuermann, "Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death," *Exp. Cell Res.*, 251(1):16-21, 1999.
- Hamon, Broccardo, Chambenoit, Luciani, Toti, Chaslin, Freyssinet, Devaux, McNeish, Marguet, Chimini, "ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine," *Nat. Cell Biol*, 2:399-406, 2000
- 40 Haran *et al.*, "Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth," *Cancer Res.*, 54(21):5511-5514, 1994.
- Harris, Zhang, Moghaddam, Fox, Scott, Pattison, Gatter, Stratford, Bicknell, "Breast cancer angiogenesis - new approaches to therapy via antiangiogenesis, hypoxic activated drugs, and vascular targeting," *Breast Cancer Res. Treat.*, 38(1):97-108, 1996.
- 45

- Hasegawa, Suzuki, Ishii, Takakuwa, Tanaka, "Establishment of two distinct anti-cardiolipin antibody-producing cell lines from the same individual by Epstein-Barr virus transformation," *Throm. Res.*, 74(1):77-84, 1994.
- Hasselaar y Sage, "SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells," *J Cell Biochem.*, 49(3):272-283, 1992.
- 5 Hastie, Patton, Hechtman, Sherpo, "Filamin redistribution in an endothelial cell reoxygenation injury model," *Free Rad. Biol. Med.*, 22:955-966, 1997.
- Hayashi, Nagashima, Terui, Kawamura, Matsumoto y Itazaki, "The structure of PA48009; the revised structure of duramycin," *J. Antibiotics*, XLIII(11):1421-1430, 1990.
- 10 Hellerqvist *et al.*, "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.
- Henson, Bratton, Fadok, "The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch?" *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2:627-633, 2001.
- Herrmann y Devaux, "Alteration of the aminophospholipid translocase activity during *in vivo* and artificial aging of human erythrocytes," *Biochim. Biophys. Acta.*, 1027(1):41-46, 1990.
- 15 Hinkovska-Galcheva, Petkova, Koumanov, "Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation," *Cytobiology*, 26(1):70-75, 1989.
- Hiscox y Jiang, "Interleukin-12, an emerging anti-tumour cytokine," *In Vivo*, 11(2):125-132, 1997.
- Holash *et al.*, "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF", *Science*, 284:1994-1998, 1999.
- 20 Hori, Chae, Murakawa, Matoba, Fukushima, Okubo, Matsubara, "A human cDNA sequence homologue of bovine phosphatidylethanolamine-binding protein," *Gene*, 140(2):293- 294, 1994.
- Hori *et al.*, "Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants," *Br. J. Pharmacol*, 118(7):1584-1591, 1996.
- 25 Hotchkiss, Ashton, Mahmood, Russell, Sparano, Schwartz, "Inhibition of endothelial cell function *in vitro* and angiogenesis *in vivo* by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center", *Mol. Cancer Ther.*, 1 (13):1191-200, 2002.
- Hristova y Needham, *In: Stealth Liposomes*, Lasic D. y Martin, F., Eds. CRC Press, Boca Raton, págs. 35-49, 1993.
- 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.
- 30 Huang, Bennett, Thorpe, "A monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on tumor blood vessels enhances the antitumor effect of docetaxel on human breast tumors in mice," *Cancer Res.*, 65:4408-4416, 2005.
- Hughes, Harris, Gharavi, "The anticardiolipin syndrome," *J. Rheumatol.*, 13:486-489, 1986.
- Hunt, Simpson, Krilis, "Identification of a region of beta-2-glycoprotein-I critical for lipid- binding and anticardiolipin antibody cofactor activity," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2141-2145, 1993.
- 35 Hunt y Krilis, "The 5th domain of beta(2)-glycoprotein-I contains a phospholipid-binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies," *J. Immunol*, 152:653-659, 1994.
- Huse, Sastry, Iverson, Kang, Alting-Mees, Burton, Benkovic, Lemer, *Science*, 246(4935):1275-1281, 1989.
- Igarashi, Umeda, Tokita, Soo Nam, Inoue, "Effective induction of anti-phospholipid and anticoagulant antibodies in normal mouse," *Thrombosis Res.*, 61:135-148, 1991.
- 40 Ingber *et al.*, "Angioinhibins: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth," *Nature*, 48:555-557, 1990.
- Iwamoto *et al.*, "Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr- Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)," *Br. J. Cancer*, 73(5):589-595, 1996.
- 45 Jackson *et al.*, "Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein," *Science*, 266(5190):1581-1584, 1994.

- Jankowski, Vreys, Wittevrongel *et al.*, "Thrombogenicity of beta(2)-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster," *Blood*, 101:157-162, 2003.
- Jendraschak y Sage, "Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology," *Semin. Cancer Biol.*, 7(3):139-146, 1996.
- 5 Jirholt, Ohlin, Borrebaeck, Soderlind, "Exploiting Sequence Space: Shuffling *In Vivo* Formed Complementarity Determining Regions Into a Master Framework," *Gene*, 215:471-476, 1998.
- Jones y Hall, "A 23 kDa protein from rat sperm plasma membranes shows sequence similarity and phospholipid binding properties to a bovine brain cytosolic protein," *Biochim. Biophys. Acta*, 1080(1):78-82, 1991.
- Jones, Dear, Foote, Neuberger, Winter, *Nature*, 321(6069):522-525, 1986.
- 10 Julien, Toumier, 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.
- Julien, Toumier, 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.
- 15 Julien, Millot, Tocanne, Toumier, "12-O-T etradecanoylphorbol-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.
- Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, pp 647-669 en particular.
- 20 Kang, Barbas, Janda, Benkovic, Lemer, *Proc. Natl Acad. Sci., U.S.A.*, 88(10):4363-4366, 1991.
- Katsuragawa, Kanzaki, Inoue, Hirano, Mori, Rote, "Monoclonal antibody against phosphatidylserine inhibits *in vitro* human trophoblastic hormone production and invasion," *Biology of Reproduction*, 56:50-58, 1997.
- Kellermann, Lottspeich, Henschen, Muller-Esterl, "Completion of the primary structure of human high-molecular-mass kininogen. The amino acid sequence of the entire heavy chain and evidence for its evolution by gene triplication," *Eur. J. Biochem.*, 154(2):471-478, 1986.
- 25 Kendall y Thomas, "Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor," *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:10705-10709, 1993.
- Kenyon, Browne, D'Amato, "Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization," *Exp. Eye Res.*, 64(6):971-978, 1997.
- 30 Keyt *et al.*, "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis," *J. Biol. Chem.*, 271(10):5638-46, 1996.
- Kim, Li, Houck, Winer, Ferrara, "The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies," *Growth Factors*, 7:53-64, 1992.
- 35 Kim *et al.*, "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*," *Nature*, 362:841-844, 1993.
- Kim, Kwak, Ahn, So, Liu, Koh, Koh, "Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3", *FEBS Lett.*, 443(3):353-6, 1999.
- Kim *et al.*, "Immunohistological analysis of immune cell infiltration of a human colon tumor xenograft after treatment with Stealth liposome-encapsulated tumor necrosis factor-alpha and radiation", *Int. J. Oncol.*, 21(5):973-9, 2002.
- 40 Kisch, y Johnson, "A plaque assay for respiratory syncytial virus," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112:583-9, 1963.
- Kitamura, Takagaki, Furuto, Tanaka, Nawa, Nakanishi, "A single gene for bovine high molecular weight and low molecular weight kininogens," *Nature*, 305(5934):545-549, 1983.
- Kitamura, Kitagawa, Fukushima, Takagaki, Miyata, Nakanishi, "Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution," *J. Biol. Chem.*, 260(14):8610- 8617, 1985.
- 45 Kitamura, Ohkubo, Nakanishi, "Molecular biology of the angiotensinogen and kininogen genes," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 10(Suppl 7):S49-S53, 1987.

- Kitamura, Nawa, Takagaki, Furuto-Kato, Nakanishi, "Cloning of cDNAs and genomic DNAs for high-molecular-weight and low-molecular-weight kininogens," *Methods Enzymol.*, 163:230-240, 1988.
- Kleinman *et al.*, "The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases," *Vitam. Horm.*, 47:161-186, 1993.
- 5 Kogure, Nakashima, Tsuchie, Tokumura, Fukuzawa, "Temporary membrane distortion of vascular smooth muscle cells is responsible for their apoptosis induced by platelet-activating factor-like oxidized phospholipids and their degradation product, lysophosphatidylcholine," *Chemistry and Physics of Lipids*, 126:29-38, 2003.
- Kohler y Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, 256:495-497, 1975.
- 10 Kohler y Milstein, "Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion," *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.
- Kondo, Asano, Suzuki, "Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194:1234-1241, 1993.
- 15 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.
- Krajewska, Wang, Krajewski, *et al.*, "Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease," *Cancer Res.*, 57(8):1605-1613, 1997.
- Kuzu, Bicknell, Fletcher, Gatter, "Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors," *Lab. Invest.*, 69(3):322-328, 1993.
- 20 Kyte y Doolittle, "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein," *J. Mol. Biol.*, 157(1): 105-132, 1982.
- Lane, Iruela-Arispe, Sage, "Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis *in vitro*. Changes in fibronectin, thrombospondin-1, and plasminogen activator inhibitor-1," *J. Biol. Chem.*, 267(23): 16736-16745, 1992.
- 25 Lee *et al.*, "Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression," *Endocrinology*, 139(9):3696-3703, 1998.
- Leppink, Bishop, Sedmak, Henry, Ferguson, Streeter, Butcher, Orosz, "Inducible expression of an endothelial cell antigen on murine myocardial vasculature in association with interstitial cellular infiltration," *Transplantation*, 48(5):874-877, 1989.
- 30 Levy, Gharavi, Sammaritano, Habina, Lockshin, "Fatty acid chain is a critical epitope for antiphospholipid antibody," *J. Clin. Immunol.*, 10(3):141-145, 1990.
- Lichtenbeld, Van Dam-Mieras, Hillen, "Tumour angiogenesis: pathophysiology and clinical significance," *Neth. J. Med.*, 49(1):42-51, 1996.
- 35 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.
- Lin, Sankar, Shan, Dewhirst, Polverini, Quinn, Peters, "Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor," *Cell Growth Differ.*, 9:49-58, 1998b.
- Linder y Borden, "Effects of tamoxifen and interferon-beta or the combination on tumor-induced angiogenesis," *Int. J. Cancer*, 71(3):456-461, 1997.
- 40 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.
- 45 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.
- Lucas, Garcia, Donati, Hribar, Mandriota, Giroud, Buurman, Franssen, Suter, Nunez, Pepper, Grau, "Both TNF receptors are required for direct TNF-mediated cytotoxicity in microvascular endothelial cells," *Eur. J. Immunol.*, 28(11):3577-3586, 1998.

- Luo, Toyoda, Shibuya, "Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody," *Cancer Res.*, 58(12):2594-2600, 1998a.
- 5 Luo *et al.*, "Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors," *Cancer Res.*, 58(12):2652-2660, 1998b.
- Lupu, Moldovan, Ryan, Stem, Simionescu, "Intrinsic procoagulant surface induced by hypercholesterolaemia on rabbit aortic endothelium," *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 4(5):743-752, 1993.
- Lutters, Meijers, Derksen, Amout, de Groot, "Dimers of beta(2)-glycoprotein I mimic the in vitro effects of beta(2)-glycoprotein I-anti-beta(2)-glycoprotein I antibody complexes," *J. Biol. Chem.*, 276:3060-3067, 2001.
- 10 Majewski *et al.*, "Vitamin D3 is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis," *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 1(1):97-101, 1996.
- Maneta-Peyret, Bessoule, Geffard, Cassagne, "Demonstration of high specificity antibodies against phosphatidylserine," *J. Immun. Meth.*, 108:123-127, 1988.
- 15 Maneta-Peyret, Freyburger, Bessoule, Cassagne, "Specific immunocytochemical visualization of phosphatidylserine," *J. Immun. Methods*, 122:155-159, 1989.
- Manetti *et al.*, "Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor," *Bioorg. Med. Chem.*, 6(7):947-958, 1998.
- Manfredi, Rovere, Galati, Heltai, Bozzolo, Soldini, Davoust, Balestrieri, Tincani, Sabbadini, "Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus - I. Opsonization by antiphospholipid antibodies," *Arthritis and Rheumatism*, 41:205-214, 1998.
- 20 Martin, Reutelingsperger, McGahon, *et al.*, "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.*, 182:1545-1556, 1995.
- Massey *et al.*, *Nature*, 328:457-458, 1987.
- 25 Matzinger, "An innate sense of danger," *Semin. Immunol.*, 10:399-415, 1998.
- McEvoy, Williamson, Schlegel, "Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(10):3311-3315, 1986.
- 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.
- 30 Mehdi, Naqvi, Kamboh, "A hydrophobic sequence at position 313-316 (Leu-Ala-Phe-Trp) in the fifth domain of apolipoprotein H (beta(2)-glycoprotein I) is crucial for cardiolipin binding," *Eur. J. Biochem.*, 267:1770-1776, 2000.
- Menon, Rahman, Ravirajan, Kandiah, Longhurst, McNally, Williams, Latchman, Isenberg, "The production, binding characteristics and sequence analysis of four human IgG monoclonal antiphospholipid antibodies", *J. Autoimmunity*, 10:43-57, 1997.
- 35 Mesiano, Ferrara, Jaffe, "Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization," *Am. J. Pathol.*, 153(4): 1249-1256, 1998.
- Millauer, Longhi, Plate, Shawver, Risau, Ullrich, Strawn, "Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*," *Cancer Res.*, 56:1615-1620, 1996.
- 40 Mills, Brooker, Camerini-Otero, "Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription," *Nucl. Acids Res.*, 18:7305-7316, 1990.
- Miyakis, Robertson Krilis, "Beta-2 glycoprotein I and its role in antiphospholipid syndrome - lessons from knockout mice," *Clin. Immunol.*, 112:136-143, 2004.
- 45 Moldovan, Moldovan, Simionescu, "Binding of vascular anticoagulant alpha (annexin V) to the aortic intima of the hypercholesterolemic rabbit. An autoradiographic study," *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 5:921-928, 1994.
- Moore *et al.*, "Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines," *J. Lab. Clin. Med.*, 132(2):97-103, 1998.
- Morrison, Johnson, Herzenberg, Oi, "Chimeric human antibody molecules: mouse antigen- binding domains with human constant region domains," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(21):6851-6855, 1984.

- Morrison, Wims, Kobrin, Oi, "Production of novel immunoglobulin molecules by gene transfection," *Mt. Sinai J. Med.*, 53(3): 175, 1986.
- Muller, *et al.*, "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface," *Structure*, 6(9):1153-67, 1998.
- 5 Muyldermans, Cambillau y Wyne, "Recognition of Antigens by Single-Domain Antibody Fragments: The Superfluous Luxury of Paired Domains," *TRENDS*, 26(4):230-235, 2001.
- Munro, "Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases," *European Heart Journal*, 14:72-77, 1993.
- 10 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 *et al.*, *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Capítulo 27.
- Nakamura y Racker, "Inhibitory Effect of Duramycin on Partial Reactions Catalyzed by (Na⁺, K⁺)-Adenosinetriphosphatase from Dog Kidney," *Biochemistry*, 23(2):385-389, 1984.
- 15 Nakanishi, Ohkubo, Nawa, Kitamura, Kageyama, Ujihara, "Angiotensinogen and kininogen: cloning and sequence analysis of the cDNAs," *Clin. Exp. Hypertens.*, 5(7-8):997-1003, 1983.
- Nilsson, Kosmehl, Zardi, Neri, "Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice," *Cancer Res.*, 61(2):711-716, 2001.
- Nimpf, Bevers, Bomans *et al.*, "Prothrombinase activity of human-platelets is inhibited by beta-2-glycoprotein-I," *Biochimica et Biophysica Acta*, 884:142-149, 1986.
- 20 Nimpf, Wurm, Kostner, "Beta2-glycoprotein-I (Apo-H) inhibits the release reaction of human- platelets during Adp-induced aggregation," *Atherosclerosis*, 63:109-114, 1987.
- Nimpf, Wurm, Kostner, "Interaction of beta-2-glycoprotein-I with human-blood platelets - influence upon the Adp-induced aggregation," *Thrombosis and Haemostasis*, 54:397- 401, 1985.
- 25 Nuttall, Irving y Hudson, "Immunoglobulin V_H Domains and beyond: Design and Selection of Single-Domain Binding and Targeting Reagents," *Current Pharma. Biotech.*, 1(3):253-262, 2000.
- Ohizumi, Tsunoda, Taniguchi, Saito, Esaki, Makimoto, Wakai, Tsutsumi, Nakagawa, Utoguchi, Kaiho, Ohsugi, Mayumi, "Antibody-based therapy targeting tumor vascular endothelial cells suppresses solid tumor growth in rats," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 236:493-496, 1997.
- Oikawa *et al.*, "A highly potent antiangiogenic activity of retinoids," *Cancer Lett.*, 48(2): 157-162, 1989.
- 30 O'Reilly *et al.*, "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma," *Cell*, 79:315-328, 1994.
- O'Reilly *et al.*, "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth," *Cell*, 88(2):277-285, 1997.
- Orr, Wang, Lafrenie, Scherbarth, Nance, "Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis," *J. Pathology*, 190:310-329, 2000.
- 35 Padlan, "Anatomy of the Antibody Molecule," *Mol. Immunol.*, 31:169-217, 1994.
- Parmley y Smith, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes," *Gene*, 73(2):305-318, 1988.
- Patey, Vazeux, Canioni, Potter, Gallatin, Brousse, "Intercellular adhesion molecule-3 on endothelial cells: Expression in tumors but not in inflammatory responses," *Am. J. Pathol*, 148:465-472, 1996.
- 40 Pepper *et al.*, "Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibits angiogenesis *in vitro*" *J. Cell Sci.*, 108(Pt 1):73-83, 1995.
- Perry, Hall, Bell, Jones, "Sequence analysis of a mammalian phospholipid-binding protein from testis and epididymis and its distribution between spermatozoa and extracellular secretions," *Biochem. J.*, 301(Pt 1):235-242, 1994.
- Pierangeli, Colden-Stanfield, Liu *et al.*, "Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells *in vitro* and *in vivo*," *Circulation*, 99:1997- 2002, 1999.
- 45 Polz, Wurm, Kostner, "Investigations on beta-2-glycoprotein-I in the rat - isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions," *Int. J. Biochem.*, 11:265-270, 1980.

- Presta, Chen, O'Connor, Chisholm, Meng, Krummen, Winkler, Ferrara, "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders," *Cancer Res*, 57:4593-4599, 1997.
- Price, "Metastasis from human breast cancer cell lines," *Breast Cancer Research Treatment*., 39:93-102, 1996.
- 5 Qamar, Gharavi, Levy, Lockshin, "Lysophosphatidylethanolamine is the antigen to which apparent antibody to phosphatidylethanolamine binds," *J. Clin. Immunol*, 10(4):200- 203, 1990.
- Qu, Conroy, Walker, Wooding, Lucy, "Phosphatidylserine-mediated adhesion of T-cells to endothelial cells," *J. Biochem.*, 317(Pt2):343-346, 1996.
- 10 Quinn *et al.*, CM101, a polysaccharide antitumor agent, does not inhibit wound healing in murine models," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 121(4):253-256, 1995.
- Ran, Gao, Duffy, Watkins, Rote, Thorpe, "Infarction of solid Hodgkin's tumors in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature," *Cancer Res.*, 58(20):4646-4653, 1998.
- Ran, Downes, Thorpe, "Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of activated endothelial cells and tumor blood vessels," *Proceedings of AACR*, No. 2615 (Abstract):527, 2002a.
- 15 Ran, Downes, Thorpe, "Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels," *Cancer Res.*, 62 6132-6140, 2002b.
- Ran y Thoipe, "Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 54: 1479-1484, 2002.
- 20 Ran, Huang, Downes, Thorpe, "Evaluation of novel antimouse VEGFR2 antibodies as potential antiangiogenic or vascular targeting agents for tumor therapy," *Neoplasia*, 5:297-307, 2003.
- Ran, He, Huang, *et al.*, "Antitumor effects of a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels in mice," *Clin Cancer Res.*, 11:1551-1562, 2005.
- Rao, Tait, Hoang, "Binding of annexin V to a human ovarian carcinoma cell line (OC-2008). Contrasting effects on cell surface factor Vila/tissue factor activity and prothrombinase activity," *Thromb. Res.*, 67(5):517-531, 1992.
- 25 Rauch, Tannenbaum, Tannenbaum, Ramelson, Cullis, Tilcock, Hope, Janoff, "Human hybridoma lupus anticoagulants distinguish between lamellar and hexagonal phase lipid systems," *J. Biol. Chem.*, 261(21):9672-9677, 1986.
- Rauch 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.
- 30 Ravirajan, Harmer, McNally, Hohmann, Mackworth-Young, Iseriberg, "Phospholipid binding specificities and idiotype expression of hybridoma derived monoclonal autoantibodies from splenic cells of patients with systemic lupus erythematosus", *Ann. Rheumatic Diseases*, 54:471-476, 1995.
- RayChaudhury y D'Amore, "Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta," *J. Cell Biochem.*, 47(3):224-229, 1991.
- 35 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.
- Riechmann y Muyldermans, "Single Domain Antibodies: Comparison of Camel VH and Camelised Human VH Domains," *J. Immunol. Methods.*, 231:25-38, 1999.
- 40 Rimassa *et al*, "Unexpected low efficacy of stealth liposomal doxorubicin (Caelyx) and vinorelbine in the treatment of metastatic breast cancer", *Breast Cancer Research and Treatment*, 77 (2): 185-8, 2003.
- Rosenthal *et al*, "A phase I study of SPI-077 (Stealth liposomal cisplatin) concurrent with radiation therapy for locally advanced head and neck cancer", *Investigational New Drugs*, 20(3)343-9., 2002.
- 45 Rote, Ng, Dostal-Johnson, Nicholson, Siekman, "Immunologic detection of phosphatidylserine externalization during thrombin-induced platelet activation," *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 66:193-200, 1993.
- Rote, Chang, Katsuragawa, Ng, Lyden, Mori, "Expression of phosphatidylserine-dependent antigens on the surface of differentiating BeWo human choriocarcinoma cells," *Am. J. Reprod. Immun.*, 33:114-121, 1995.

- Rote, "Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss," *Am. J. Reprod. Immun.*, 35:394-401, 1996.
- Roubey, Eisenberg, Harper, Winfield, "Anticardiolipin autoantibodies recognize beta(2)-glycoprotein-I in the absence of phospholipid - importance of Ag density and bivalent binding," *J. Immunol.*, 154:954-960, 1995.
- 5 Ruf, Rehemtulla, Edgington, "Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function," *Biol. Chem.*, 266:2158-2166, 1991.
- Ruf y Edgington, "Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis *in vivo*," *FASEB J.*, 8:385-390, 1994.
- Sakamoto *et al.*, "Heparin plus cortisone acetate inhibit tumor growth by blocking endothelial cell proliferation," *Canc. J.*, 1:55-58, 1986.
- 10 Saleh, Stacker, Wilks, "Inhibition of growth of C6 glioma cells *in vivo* by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence," *Cancer Res.*, 56:393-401, 1996.
- Sambrook, Fritsch, Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sang, "Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis," *Cell Res.*, 8(3):171-177, 1998.
- 15 Sanlioglu, Williams, Samavati, Butler, Wang, McCray, Ritchie, Hunninghake, Zandi, and Engelhardt, *J. Biol. Chem.*, 32:30188, 2001.
- Schlaepfer, Mehlman, Burgess, Haigler, "Structural and functional characterization of endonexin II, a calcium- and phospholipid-binding protein," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(17):6078-6082, 1987.
- 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.
- 25 Schousboe, "Beta-2-glycoprotein-I - a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood-coagulation pathway," *Blood*, 66:1086-1091, 1985.
- Seigneuret y Devaux, "ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(12):3751-3755, 1984.
- Sessions y Horwitz, "Myoblast aminophospholipid asymmetry differs from that of fibroblasts," *FEBS Lett.*, 134(1):75-78, 1981.
- 30 Shaughnessy, Buchanan, Tuiple, Richardson, Orr, "Walker carcinosarcoma cells damage endothelial cells by the generation of reactive oxygen species" *Am. J. Path.*, 134(4):787-796, 1989.
- Sheibani y Frazier, "Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(15):6788-6792, 1995.
- 35 Sheng, Sali, Herzog, Lahnstein, Krilis, "Site-directed mutagenesis of recombinant human beta(2)-glycoprotein I identifies a cluster of lysine residues that are critical for phospholipid binding and anti-cardiolipin antibody activity," *J. Immunol.*, 157:3744- 3751, 1996.
- Sheu *et al.*, "Inhibition of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody," *Biochim. Biophys. Acta*, 1336(3):445-454, 1997.
- 40 Shotwell, Stodola, Michael, Lindenfelser, Dworschack and Pridham, "Antibiotics Against Plant Disease. III. Duramycin, a New Antibiotic from *Streptomyces Cinnamomeus* Forma *Azacoluta*," *N. Utiliza. Res. Dev. Div.*, 80:3912-3915, 1958.
- Sideras, Mizuta, Kanamori, Suzuki, Okamoto, Kuze, Ohno, Doi, Fukuhara, Hassan, *et al.*, "Production of sterile transcripts of C gamma genes in an IgM-producing human neoplastic B cell line that switches to IgG-producing cells," *Intl. Immunol.*, 1(6):631-642, 1989.
- 45 Siemann, Mercer, Lepler, Rojiani, "Vascular targeting agents enhance chemotherapeutic agent activities in solid tumor therapy," *Int. J. Cancer*, 99:1-6, 2002.

- Siemeister, Martiny-Baron, Marme, "The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities," *Cancer Metastasis Rev.*, 17(2):241-248, 1998.
- Siim, Lee, Shalal-Zwain, Prujin, McKeage, Wilson, "Marked potentiation of the antitumor activity of chemotherapeutic drugs by the antivasular agent 5, 6-dimethylxanthenone- 4-acetic acid (DMXAA)," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 51:43-52, 2004.
- 5 Simantov, Lasala, Lo *et al.*, "Activation of cultured vascular endothelial-cells by antiphospholipid antibodies," *J. Clin. Invest.*, 96:2211-2219, 1995.
- Singh *et al.*, "Stealth monensin liposomes as a potentiator of adriamycin in cancer treatment", *Journal of Controlled Release*, 59(1):43-53, 1999.
- 10 Sioussat, Dvorak, Brock, Senger, "Inhibition of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) with antipeptide antibodies," *Arch. Biochem. Biophys.*, 301:15-20, 1993.
- Sipos *et al.*, "Inhibition of tumor angiogenesis," *Ann. NY Acad. Sci.*, 732:263-272, 1994.
- Sluiter, Pietersma, Lamers, Koster, "Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium: their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanisms underlying their expression," *J. Cardiol. Pharmacol.*, 22:S37-S44, 1993.
- 15 Smirnov, Triplett, Comp, Esmon, Esmon, "On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies," *J. Clin. Invest.*, 95(1):309-316, 1995.
- Soares, Shaughnessy, MacLarkey, Orr, "Quantification and morphologic demonstration of reactive oxygen species produced by Walker 256 tumor cells *in vitro* and during metastasis *in vivo*," *Laboratory Invest.*, 71(4):480-489, 1994.
- 20 Soderlind, Ohlin y Carlsson, "Complementarity-Determining Region (CDR) Implantation: A Theme of Recombination," *Immunotech.*, 4:279-285, 1999.
- Soderlind, Strandberg, Jirholt, Kobayashi, Alexeiva, Aberg, Nilsson, Jansson, Ohlin, Wingren, Danielsson, Carisson and Borrebaeck, "Recombining Germline-Derived CDR Sequences for Creating Diverse Single-Framework Antibody Libraries," *Nature Biotech.*, 18:852-856, 2000.
- 25 Soff *et al.*, "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model," *J. Clin. Invest.*, 96(6):2593-2600, 1995.
- Staal-van den Brekel, Thunnissen, Buurman, Wouters, "Expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 in non-small-cell lung carcinoma," *Virchows Arch.*, 428:21-27, 1996.
- 30 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.
- Steinkasserer, Barlow, Willis *et al.*, "Activity, disulfide mapping and structural modeling of the 5th domain of human-beta-2-glycoprotein-I," *FEBS Letters*, 313:193-197, 1992.
- 35 Steinkasserer, Estaller, Weiss, Sim, Day, "Complete nucleotide and deduced amino-acid- sequence of human beta-2-glycoprotein-I, *Biochem. J.*, 277:387-391, 1991.
- Stella *et al.*, "Prodrugs: A chemical approach to targeted drug delivery ", *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, Eds. Human Press, 1985, págs. 247-267.
- 40 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.
- Sunderkotter, Steinbrink, Goebeler, Bhardwaj, Sorg, "Macrophages and angiogenesis," *J. Leukocyte Biol.*, 55:410-422, 1994.
- 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.
- Symon *et al.*, "Selective delivery of doxorubicin to patients with breast carcinoma metastases by stealth liposomes", *Cancer*, 86(1):72-8, 1999.
- 5 Tada *et al.*, "Inhibition of tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells by co-culture with chondrocytes and involvement of transforming growth factor beta: a model for avascularity in human cartilage," *Biochim. Biophys. Acta*, 1201(2):135-142, 1994.
- Tait y Smith, "Phosphatidylserine receptors: role of CD36 in binding of anionic phospholipid vesicles to monocytic cells," *J. Biol. Chem.*, 274(5):3048-3054, 1999.
- 10 Takano *et al.*, "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.
- Tanaka *et al.*, "Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth," *Nat. Med.*, 3(4):437-442, 1997.
- 15 Test y Mitsuyoshi, "Activation of the alternative pathway of complement by calcium-loaded erythrocytes resulting from loss of membrane phospholipid asymmetry," *J. Lab. Clin. Med.*, 130(2): 169-182, 1997.
- Thornhill, Kyan-Aung, Haskard, "IL-4 increases human endothelial cell adhesiveness for T cells but not for neutrophils," *J. Immunol.*, 144:3060-3065, 1990.
- 20 Thorpe *et al.*, "Heparin-Steroid Conjugates: New Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice," *Cancer Res.*, 53:3000-3007, 1993.
- Thorpe y Ran, "Tumor infarction by targeting tissue factor to tumor vasculature", *Cancer J. Sci. Am.*, 6(Suppl 3):S237-S244, 2000.
- Thorpe, "Vascular targeting agents as cancer therapeutics," *Clin. Cancer Res.*, 10:415-427, 2004.
- Tolsma *et al.*, "Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity," *J. Cell Biol*, 122(2):497-511, 1993.
- 25 Tryggvason, "The laminin family," *Curr. Opin. Cell Biol*, 5(5):877-882, 1993.
- Tsavaris, Kosmas, Vadiaka, Kanelopoulos, Boulamatsis, "Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes", *Brit. J. Cancer*, 87(1):21-7, 2002.
- 30 Umeda, Igarashi, Nam, Inoue, "Effective production of monoclonal antibodies against phosphatidylserine: Stereo-specific recognition of phosphatidylserine by monoclonal antibody," *J. Immun.*, 143(7):2273-2279, 1989.
- Umeda y Emoto, "Membrane Phospholipid Dynamics During Cytokinesis: Regulation of Actin Filament Assembly by Redistribution of Membrane Surface Phospholipid", *Chem. Phys. Lipids*, 101:81-91, 1999.
- Utsugi, Schroit, Connor, Bucana, Fidler, "Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes," *Cancer Res.*, 51(11):3062-3066, 1991.
- 35 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.
- 40 van Dijk, Wamaar, van Eendenburg, Thienpont, Braakman, Boot, Fleuren, Bolhuis, "Induction of tumor-cell lysis by bi-specific monoclonal antibodies recognizing renal-cell carcinoma and CD3 antigen," *Int. J. Cancer*, 43:344-349, 1989.
- van Gorp, Broers, Reutelingsperger, Bronnenberg, Homstra, Dam-Mieras, Heemskerk, "Peroxide-induced membrane blebbing in endothelial cells associated with glutathione oxidation but not apoptosis," *Am. J. Physiol*, 277:C20-C28, 1999.
- 45 van Gorp, Homstria, Van Dam-Mieras, Heemskerk, "Function of glutathione peroxidase in endothelial cell vitality," *Arch. Biochem. Biophys.*, 382(1):63-71, 2000.
- van Goip, Heeneman, Broers, Bronnenberg, Van Dam-Mieras, Heemskerk, "Glutathione oxidation in calcium- and p38 MAPK-dependent membrane blebbing of endothelial cells," *Biochim. Biophys. Acta*, 1591(1-3):129-138, 2002.

- van Lummel, Pennings, Derksen, Urbanus, Lutters, Kaldenhoven, de Groot, "The binding site in β 2-glycoprotein I for ApoER2' on platelets is located in domain V," *J. Biol. Chem.*, 280(44):36729-36, 2005.
- Vitetta *et al.*, "Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma," *Cancer Res.*, 15:4052-4058, 1991.
- 5 Vlachoyiannopoulos, Beigbeder, Duelanes, Youinou, Hunt, Krihis, 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.
- 10 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*, 95(11):6343-6348, 1998.
- Vukanovic *et al.*, "Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide," *Cancer Res.*, 53(8): 1833-1837, 1993.
- 15 Wakamatsu, Choung, Kobayashi, Inoue, Higashijima y Miyazawa, "Complex Formation of Peptide Antibiotic Ro09-0198 with Lysophosphatidylethanolamine: ^1H NMR Analysis in Dimethyl Sulfoxide Solution," *Biochemistry*, 29(1):113-118, 1986.
- Waltenberger *et al.*, "Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action," *J. Mol. Cell Cardiol.*, 28(7): 1523-1529, 1996.
- 20 Wamil *et al.*, "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," *Cancer Res. Clin. Oncol.*, 123(3):173-179, 1997.
- Wang y Joseph, "Mechanisms of hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC 12 cells," *Free Rad. Biol. Med.*, 28(8):1222-1231, 2000.
- 25 Wells, "Starving cancer into submission", *Chem. Biol.*, 5(4):R87-88, 1998.
- Whitworth, Pak, Esgro, Kleinerman, Fidler, "Macrophages and Cancer," *Cancer Meta. Rev.*, 8:319-351, 1990.
- Wiesmann, *et al.*, "Crystal structure at 1.7 A resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor," *Cell*, 91(5):695-704, 1997.
- 30 Weiss, Young, LoBuglio, Slivka y Nimeh, "Role of Hydrogen Peroxide in Neutrophil- Mediated Destruction of Cultured Endothelial Cells," *J. Clin. Invest.*, 68:714-721, 1981.
- Williamson y Schlegel, "Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells," *Molec. Mem. Biol.*, 11:199-216, 1994.
- Willems, Janssen, Pelsers *et al.*, "Role of divalency in the high-affinity binding of anticardiolipin antibody-beta(2)-glycoprotein I complexes to lipid membranes," *Biochemistry*, 35:13833-13842, 1996.
- 35 Willman *et al.*, "Prodrugs in cancer therapy", *Biochem. Soc. Trans.*, 14:375-382, 1988.
- Winter y Milstein, "Man-made antibodies," *Nature*, 349:293-299, 1991.
- Wolff *et al.*, "Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures *in vitro* and angiogenesis *in vivo*," *Klin. Padiatr.*, 209(4):275-277, 1997.
- Woodle, Engbers, Zalipsky, *Bioconjugate Chem.*, 5:493-496, 1994.
- 40 Wurm, "beta 2-Glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles," *Int. J. Biochem.*, 16:511-15, 1984.
- Xie, Padron, Liao, Wang, Roth y De Brabander, "Salicylilalamide A inhibits the V_0 sector of the V-ATPase through a mechanism distinct from bafilomycin A_1 ," *J. Biol. Chem.*, 279(19): 19755-63, 2004.
- 45 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 *et al.*, "Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis," *Semin. Cancer Biol.*, 4(4):259-265, 1993.
- Yasuda, Tsutsumi, Chiba *et al.*, "Beta(2)-glycoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis," *Atherosclerosis*, 152:337-346, 2000.
- 5 Yasuda *et al.*, *Blood*, 103:3766-3772, 2004.
- Yoon *et al.*, "Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice," *Cancer Lett.*, 97(1):83-91, 1995.
- Yoshida *et al.*, "Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP470: possible involvement of nitric oxide synthase," *Cancer Res.*, 58(16):3751-3756, 1998.
- 10 Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062, 1995.
- Zhao, Zhou, Wiedmer, Sims, "Level of expression of phospholipid scramblase regulates induced movement of phosphatidylserine to the cell surface," *J. Biol. Chem.*, 273:6603-6606, 1998.
- Zhou, Zhao, Stout, Luhm, Wiedmer, Sims, "Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids," *J. Biol. Chem.*, 272(29):18240-18244, 1997.
- 15 Ziche *et al.*, "Linomide blocks angiogenesis by breast carcinoma vascular endothelial growth factor transfectants," *Br. J. Cancer*, 77(7):1123-1129, 1998.
- Zulueta, Yu, Hertig, Thannickal, Hassoun, "Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane," *Mm. J. Respir. CellMol. Biol.*, 12(1):41-49, 1995.
- 20 Zwaal, Bevers, Comfurius, Rosing, Tilly, Verhallen, "Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and sickled red cells; mechanisms and physiological significance," *Mol. Cell. Biochem.*, 91:23-31, 1989.
- Zwaal y Schroit, "Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells," *Blood*, 89(4):1121-1132, 1997.
- 25

Listado de secuencias

<110> The University of Texas System Peregrine Pharmaceuticals, Inc.
 Thorpe, Philip E.
 5 Luster, Troy A.
 King, Steven W.

<120> CONSTRUCCIONES DE FUSIÓN A FC DE UNIÓN A FOSFATIDILSERINA Y SU USO TERAPÉUTICO

10 <130> 4001.003210

<140> Desconocido
 <141> 24-01-2006

15 <150> 60/646.333
 <151> 24-01-2005

<160> 25

20 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
 <211>519
 <212>ADN
 25 <213>Mus musculus

<400> 1
 atgggatgga cctggatcct tattttaatc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactctgag 60
 gtccagctgc agcagctctgg acctgagctg gagaagcctg gcgcttcagt gaagctatcc 120
 tgcaaggcct ctggttactc attcactggc tacaacatga actgggtgaa acagagccat 180
 ggaaagagcc ttgaatggat tggacatatt gatccctact atggtgatac ttcctacaac 240
 cagaagttca ggggcaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 cagctcaaga gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgtaaa ggggggttac 360
 tacgggcaact ggtacttoga tgtctggggc gcagggacca cggtcaccgt ctccctcagct 420
 acaacaacag ccccatctgt ctatcccttg gtcccggggc gatcccccg gctgcaggaa 480
 ttgatataca agottatoga taccgtcgac ctogagggg 519

<210> 2
 <211> 152
 30 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Gly Trp Thr Trp Ile Phe Ile Leu Ile Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys
 20 25 30

ES 2 565 543 T3

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly His Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Val Lys Gly Gly Tyr Tyr Gly His Trp Tyr Phe Asp Val
 115 120 125

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Thr Thr Thr Ala
 130 135 140

Pro Ser Val Tyr Pro Leu Val Pro
 145 150

<210> 3
 <211> 435
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 3
 atggacatga gggctcctgc acagattttg ggcttcttgt tgetcttgtt tccaggtacc 60
 agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tctctcttat ctgcctctct gggagaaaga 120
 gtcagtctca cttgtcgggc aagtcaggac attggtagta gcttaaactg gcttcagcag 180
 ggaccagatg gaactattaa acgcctgac tacgccacat ccagtttaga ttctggtgtc 240
 cccaaaaggt tcagtggcag taggtctggg tcagattatt ctctcaccat cagcagcctt 300
 gagtctgaag atttttaga ctattactgt ctacaatat ttagttctcc tcccagttc 360
 ggtgctggga ccaagctgga gctgaaacgg gctgatgctg caccaactgt cttcatcttc 420
 gggcggatcc cccgg 435

10 <210> 4
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

<400> 4

Met Asp Met Arg Ala Pro Ala Gln Ile Leu Gly Phe Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Phe Pro Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Gly Ser Ser Leu Asn Trp Leu Gln Gln Gly Pro Asp Gly
50 55 60

Thr Ile Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Lys Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln
100 105 110

Tyr Val Ser Ser Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
115 120 125

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Phe Ile Phe Gly Arg Ile Pro
130 135 140

<210> 5

<211> 783

5 <212> ADN

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO

10

<400> 5

gccagccgg ccatggccga ggtgcagctg gtggagtctg ggggagggct ggtccagcct 60

gggaggtccc tgagactctc ctgtgcagcc tctggattca ccttcagtag ctatggcatg 120

cactgggtcc gccaggctcc aggcaagggg ctggagtggg tggcagttat atcatatgat 180

ggaagtaata aatactatgc agactccgtg aagggccgat tcaccatctc cagagacaat 240

tccaagaaca cgctgtatct gcaaatgaac agcctgagag ctgaggacac ggccgtgtat 300

tactgtgcaa gattgcatgc tcagacttgg ggccaaggta ccctggtcac cgtctcagat 360

ES 2 565 543 T3

ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtagtg cacttcagtc tgtgctgacg 420
 cagccgectt cagtgtctgc ggccccagga cagaaggcca ccatctcctg ctctggaagc 480
 agctccgaca tggggaatta tgcggtatcc tgggtaccagc agcteccagg aacagccccc 540
 aaactcctca tctatgaaaa taataagcga ccctcaggga ttctgaccg attctctggc 600
 tccaagtctg gcacctcagc caccctgggc atcaactggcc tctggcctga ggacgaggcc 660
 gattattact gcttagcatg ggataccagc ccgcggaatg tattcggcgg agggaccaag 720
 ctgaccgtcc taggtgcggc cgcacatcat catcaccatc acggggccgc agaacaaaaa 780
 etc 783

<210> 6

<211> 261

<212> PRT

5 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> POLIPÉPTIDO

<400> 6

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

Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 50 55 60

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 65 70 75 80

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu His Ala Gln Thr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Ala Leu Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser

10

ES 2 565 543 T3

130

135

140

Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser
145 150 155 160

Ser Ser Asp Met Gly Asn Tyr Ala Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro
165 170 175

Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Asn Asn Lys Arg Pro Ser
180 185 190

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr
195 200 205

Leu Gly Ile Thr Gly Leu Trp Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
210 215 220

Leu Ala Trp Asp Thr Ser Pro Arg Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala His His His His His His Gly Ala
245 250 255

Ala Glu Gln Lys Leu
260

<210> 7
<211> 20
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

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

Ser Thr Ser Gly
20

10 <210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
1 5 10 15

15 <210> 9
<211> 19

<212> PRT
 <213> Streptomyces cinnamoneus

<220>
 5 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (11)..(18)
 <223> Xaa = Abu

<400> 9

Ala Lys Gln Ala Ala Ala Phe Gly Pro Phe Xaa Phe Val Ala Asp Gly
 1 5 10 15

Asn Xaa Lys

10 SEQ NO:10 (Cadena Pesada 3G4 IgG2a)

```

1 /----- líder -----\-----
  MGWTWIFILI LSVTTGVHSE VQLQQSGPEL EKPGASVKLS CKASGYSFTG YNMNWKQSH GKSLEWIGHI
71 -----3G4 VH-----\-----
  DPYYGDTSYN QKFRGKATLT VDKSSSTAYM QLKSLTSEDS AVYYCVKGGY YGHWFYDVMG AGTTVTVSSA
141 -----; Dominio CH1 de IgG2a de ratón -----\-----
  KTTAPSVYPL APVCGDTTGS SVTLGCLVKG YFPEVTLTW NSGSLSSGVH TFFAVLQSDL YTLSSSVTVT
211 -----\----- bisagra -----\-----
  SSTWPSQSIT CNVAHFASST KVOKKEPRGP TIKPCPFCKC PAPNLLGGPS VFIFPPKIKD VLMISLSEIV
281 -----; Dominio CH2 de IgG2a de ratón -----\-----
  TCVVDVISED DDPVQISWFV NNVEVHTAQT QTHREDYNST LRVVSALPIQ HQDWMGKEF KCKVNNKDLF
351 -----\-----; Dominio CH3 de IgG2a de ratón -----\-----
  APIERTISKP KGSVRAPQVY VLPPFEEEMT KKQVTLTCMV TDFMPEDIYV EWTNNGKTEL NYKNTEPVLD
421 -----\-----
  SDGSYFMYSK LRVERKNWVE RNSYSCSVVH EGLNHRHTK SFSRTPGK
    
```

15 SEQ ID NO:11 (Cadena Ligera 3G4, C_K)

```

1 /----- líder -----\-----
  MDMRAPAQIL GFLLLLFPGT RCDIQMTQSP SLSASLGER VSLTCRASQD IGSSLNWLQQ GPDGTIRRLI
71 -----3G4 VL-----\-----
  YATSSLDGCV PRRFSGSRSG SDYSLTISSL ESEDFVDYIC LQVSSPPTF GAGTKLELKR ADAAPTVSIF
141 -----; c-kappa de ratón -----\-----
  PPSSEQLTSG GASVVCFLNN FYPKDINVKW KIDGSEKONG VLNSWTDQDS KDSTYSMSST LTLTKDEYER
211 -----\-----
  HNSYTCEATH KTSTSPIVKS FNRNEC
    
```

SEQ ID NO:12

20 5'-GGAATTCGGACGGACCTGTCCCAAGC-3'

SEQ ID NO:13

5'-GGAATTCGTATGTCCTTTTGC-3'

25 SEQ ID NO:14

5'-GGAATTCGCTCCCATCATCTGC-3'

SEQ ID NO:15

5'-GGAATTCGTAAAATGCCCATTC-3'

30 SEQ ID NO:16

5' -GGAATTCGCATCTTGTAAGTAC-3'

SEQ ID NO:17

5' -TTCTAGATTAGCATGGCTTTAC-3'

SEQ ID NO:18 (péptido de señal)

MDMRAPAQILGFLLLLFPGTRCLR

5

SEQ ID NO:19 (Fc-mB2GPI maduro)

```

/-----\
1
bisagra
EPRGPT IKPCPPCKCP APNLLGGPSV FIFPPKIKDV LMISLSPIVT CVVVDVSEDD
-----
Dominio CH2 de IgG2a de ratón
56 PDVQISWEVN NVEVHTAQTQ THREDYNSTL RVVSALPIQH QDWMGKFEK CKVNNKDLPA PIERTISKPK GSVRAPOQVYV
-----
Dominio CH3 de IgG2a de ratón
136 LPPPEEEMTK KQVTLTCMVT DMPEDIYVE WTNNGKTELN YKNTPEVLDS DGSYFMYSKL RVEKKNWVER NSYSCSVVHE
-----
216 GLHNHHTTKS FSRTPGKTGG RICPKPDDL FATVVPLKTS YDFGEQIVYS CKPGYVSRGG MRRFTCPLTG MWPINTLRCV
[-----]
Dominio I
-----
296 PRVCPFAGIL ENGIVRYTSE EYFKNISFAC NPGFELNGTS SSKTEEGKW SPDIPACARI TCPPPPVPEK ALLKDYRPSA
[-----]
Dominio II
-----
376 GNNSLYQDTV VFKCLPHFAM IGNDTVMCTE QGNWTRLEPC LEVKCFEPPR FENGYVNYPA KPVLLYKDKA TFGCHETYKL
[-----]
B2GPI ratón
Domain III
Dominio IV
-----
456 DGPEEAECTK TRTWSFLPTC RESCKLPVK ATVLYQGMRV KIQEQFKNGM MHGDKIHFYC KNKEKCSYT VEAHCRDGTI
[-----]
Dominio V
-----
536 EIPSCFKEHS SLAFWKTDAS ELTPC

```

SEQ ID NO:20

KNKEKCSYTVEAHCRDGTIEIPSCFKEHSSLAFWK

10

SEQ ID NO:21 (región constante de cadena pesada IgG₁ humano)

```

/-----\
región CH1
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFEEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
-----
YICNVNKKPS NTKVDKRVEP KSCDKTATCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKE KDTLIMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
-----
región CH2
YVDGVEVHNA KTKPREEQIVW STYRVVSVLT VLNQDWNCK EYCKVSNKA LPAPIERTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
-----
región CH3
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDDSGSFLY SKLTVDKSRW QGQNVFSCSV MHEALHNHYT
-----
QKSLSLSPG

```

15

SEQ ID NO:22 (β2GPI humano)

```

/-----\
Dominio I
1 GRTCPKPDLL PFSTVVPLKT EYEPGEEITY SCKPGYVSRG GMRKFCPLT GLWPINTLRC TPRVCPFAGI LENGAVYTT
-----
Dominio II
81 FEYPTISFS CNTGFYLNQA DSAKTEEGK WSEPELVCAP IICPPSIPT FATLRVYKPS AGNNSLYRDT AVFECLPQHA
-----
Dominio III
-----
161 MFGNDTITCT TEGNWTLPKE CREVKCFEPPS RPDNGFVNYF AKPTLYYKDK ATPGCHDGYL LGGPEELECT KLGWWSAMPS
-----
Dominio IV
-----
241 CKASCKLPVK KATVVYQGER VKIQEKFRNG MLHGDKVSEF CKNKEKCSY TEDAQCIDGT IEVPKCFKEH SSLAFWKTD
-----
321 SDVKPC

```

ES 2 565 543 T3

SEQ ID NO:23 (Fc-B2GPI, Fc-hB2GPI humano)

```
-----\/- bisagra -----\/-  
EP KSCDKRTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKPK KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW  
----- región CH2 -----\/-  
YVDGVEVHNA KTRPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYRCKVSNKA LPAPIERTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE  
----- región CH3 -----  
LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALRNHYT QKSLSLSPG  
/----- Dominio I -----\/-  
GRTCPKPDLL PFTVVELKT FYEPGEEITY SCKPGYVSRG GMRKFCPLT GLWPINTLRC TPRVCFAGI LENGAVRYTT  
----- Dominio II -----\/- ----- Dominio III -----  
FEYPTISFS CNTGFYLNKA DSAKCTEEGK WPELPCAP IICPPPSIPT FATLRVYKPS AGNNSLYRDT AVFECLPQHA  
-----\/- ----- Dominio IV -----  
MFGNDTITCT THGNWTKLPE CREVKCPFFS RPDNGFVNYP AKPTLYYKDK ATEGCHDGYS LDGPEEIECT KLGWNSAMPS  
-\/- ----- Dominio V -----  
CKASCKLPVK KATVVYQGER VKIQEKFKNG MLHGDKVSEF CKNKEKACS YTEDAQCIDGT IEVPKCFKEH SSLAFWKTD  
-----\  
SDVKPC
```

5

SEQ ID NO:24

KNKEKKCSYTEDAQCIDGTIEVPKCFKEHSSLAFWK

SEQ ID NO:25 (plásmido Fc-mB2GPI)

```

1      AGCTTCGCGA CGTACGTTCC AACCCTGGCC GCCACCATGG ACATGAGGGC TCCTGCACAG ATTTTGGGCT
71     TCGAAGCGCT GCATGCAAGC TTGGGCCCCG CGGTGGTACC TGTACTCCCG AGGACGTGTC TAAAACCCGA
      TCTFTTGGCT CTTGTTTCCA GGTACCAGAT GCCTAAGGGA GCCCAGAGGG CCCACAATCA AGCCCTGTCC
141    AGAACAACGA GAACAAAGGT CCATGGTCTA CGGATTCCCT CGGGTCTCCC GGGTGTAGT TCGGGACAGG
      TCCATGCAAA TGCCCAGGTA AGTCACTAGA CCAGAGCTCC ACCCGGGAGA ATGGTAAAGT CTGTAACAT
211    AGGTACGTTT ACGGGTCCAT TCAGTGATCT GGTCTCGAGG TGGGCCCTCT TACCATTAC GACATTTGTA
      CCCTGCACFA GAGGATAAGC CATGTACAGA TCCATTTCCA TCTCTCCTCA TCAGCACCTA ACCTTTGGG
281    GGGACGTGAT CTCCTATFCG GTACATGTCT AGGTAAGGT AGAGAGGAGT AGTCGTGGAT TGGAGAACC
      TGGACCATCC GTCTTCATCT TCCCTCCAAA GATCAAGGAT GTACTCATGA TCTCCCTGAG CCCCATAGTC
351    ACCTGGTAGG CAGAAGTAGA AGGGAGGTTT CTAGTTCCTA CATGAGTACT AGAGGGACTC GGGGTATCAG
      ACATGTGTGG TGGTGGATGT GAGCGAGGAT GACCCAGATG TCCAGATCAG CTGGTTGTG AACACCGTGG
      TGTACACACC ACCACCTACA CTCGCTCCTA CTGGGTCTAC AGGTCTAGTC GACCAAACAC TTGTTGCC
421    AAGTACACAC AGCTCAGACA CAAACCCATA GAGAGGATTA CAACAGTACT CTCGGGTGG TCAGTGCCT
      TTCATGTGTG TCGAGTCTGT GTTTGGGTAT CTCTCCTAAT GTTGTCTAGA GAGGCCACCC AGTCACCGGA
491    CCCCATCCAG CACCAGGACT GGATGAGTGG CAAGGAGTTC AAATGCAAGG TCAACACAA AGACCTCCGA
      GGGGTAGGTC GTGGTCTCGA CCTACTCACC GTTCTCAAG TTTACGTTCC AGTGTGTGT TCTGGAGGGT
561    CGGCCCATCC AGAGAACCAT CTCAAAACCC AAAGGTGAGA GCTGCAGCCT GACTGCATGG GGGCTGGGAT
      CGCGGGTAGC TCTCTTGGTA GAGTTTTGGG TTTCCACTCT CGACGTCGGA CTGACGTACC CCCGACCCTA
631    GGGCATAAGG ATAAAGTCT GTGTGGACAG CCTCTGCTT CAGCCATGAC CTTTGTGTAT GTTCTACCC
      CCCGTATTCC TATTTCCAGA CACACCTGTC GGAAGCAGAA GTCCGTACTG GAAACACATA CAAGATGGG
701    TCACAGGCTC AGTAAGAGCT CCACAGGTAT ATGTCTTGCC TCCACCAGAA GAAGAGATGA CTAGAAACA
      AGTGTCCCGT TCATTCTCGA GGTGTCCATA TACAGAACGG AGGTGGTCTT CTTCTCTACT GATTCCTTGT
771    GGTCACTCTG ACCTGCATGG TCACAGACTT CATGCCTGAA GACATTTACG TGGAGTGGAC CAACACCGG
      CCAGTGAGAC TGGACGTACC AGTGTCTGAA GTACGGACTT CTGTAAATGC ACCTCACCTG GTGTGGCCC
841    AAACAGAGC TAACTACAA GAACACTGAA CCAGTCTGG ACTCTGATGG TTCTACTTC ATGTACAGCA
      TTTTGTCTCG ATTTGATGTT CTTGTGACTT GGTCAAGGACC TGAGACTACC AAGAATGAAG TACATGTGCT
911    AGCTCAGAGT GGAAGAAGC AACTGGGTGG AAAGAATAG CTACTCCTGT TCAGTGGTCC ACGAGGGTCT
      TCGACTCTCA CCTTTCTTC TTGACCCACC TTTCTTATC GATGAGGACA AGTCACCAGG TGTCCCAGA
981    GCACATCACC CACACGACTA AGAGCTTCTC TCGGACTCCG GGTAAAACCG GGGACCGGAT CTGTCCGAG
      CGTGTAGTGT GTGTGCTGAT TCTCGAAGAG AGCCTGAGGC CCATTTTGGC CCCCTGCCTA GACAGGCTTC
1051   CGGATGACCC TACCATTGTC TACGGTTGTC CCTTAAAGA CATCCTACGA CCCCTGGGGAG CAGATTGGCT
      GGCCTACTGG ATGGTAAACG ATGCCAACAG GGGAAATTCT GTAGGATGCT GGGACCCCTC GTCTAACAGA
1121   ACTCCTGCAA GCCAGGCTAC GTGTCCAGGG CAGGGATGAG ACGGTTTACC TGTCTCTCA CAGGAATGTC
      TGAGCAGCTT CGGTCGATG CACAGGCTCC CTCCCTACTC TCCCAAATGT ACAGGAGAGT GCTCTACAC
1191   GCCCATCAAC ACCCTGAGAT GTGTCCCAG AGTATGTCC TTCGCTGGAA TCTTAGAATA TGAATGTGA
      CGGGTAGTTG TGGGACTCTA CACAGGGGTC TCATACAGGA AAGCGACCTT AGAATCTTTT ACCTTAACAT
1261   CGCTACACGA GTTTTGAATA TCCCAAGAAC ATCAGTTTGG CTTGTAACCC TGGGTTTTTT CTGAATGGGA
      GGAGATGTCT CAAAACCTTAT AGGGTCTTG TAGTCAAAAC GAACATTTGG ACCCAAATAA GACTTACCT
1331   CCAGCTCACC TAAGTGCACC GAGGARGGAA AATGAGGCC AGATATTCCT GCTGTGCTC GCATCACCTG
      GGTCCGATTA ATCAGCTGTC CTCCTTCCTT TTACTCAGGG TCTATAAGGA CGAACACGAG CGTAGTGGAC
1401   CCCGCCACCA CAGTTCCAA AGTTTGCCG CCTTAAGGAT TATAGGCCCT CAGCTGGGAA CAECTCTTTG
      GGGCGGTGGT GGTCAAGGTT TCAACCGTGA GGAATTCCTA ATATCCGGAA GTCGACCCTT GTTGAGAAC
1471   TATCAGGACA CAGTGTCTT TAAATGCTTG CCACACTTTG CCATGATCGG AAATGACACA GTCATGTGCA
      APAGTCCCTG GTACCAGAA ATTTACGAAC GGTGTGAARC GGTACTAGCC TTTACTGTGT CAGTACAGCT
1541   CAGAACAAGG AACTGGACC AATGCCCAG AATGCCCTGA AGTAAAATGT ACCCTCCCTC CGAGGCCAGA
      GTCTTGTFTC TTTGACCTGG GCTAACGGTC TTACGGACCT TCATTTTACA GGGAAGGGAG GCTCCGGTCT
1611   AAATGGGTAT GTGAATTATC CTGCAAGGCC GGTGCTTCTA TATAAGGATA AAGCCACAT TGGTGGCCAT
      TTTACCCATA CACTTAATAG GACGTTTCGG CCACGAGAT ATATTCCTAT TTCGGTGTAA ACCAACGGTA
1681   GAGACATACA AGCTGGACGG CCCAGAAGAA GCGGAATGTA CCAAGACGAG AACTTGGTCC TTCTTGCCGA
      CTCTGTATGT TCGACCTGCC GGGTCTTCT CGCCTTACAT GGTCTGTCTC TTGAACCAGG AAGAACGGCT
1751   CCTGTAGAGA GTCTTGCAA CTCCCCTTA AGAAAGCCAC CGTGCTGTAC CAAGGGATGA GGGTGAAGAT
      GGACRTCTCT CAGAACGTTT GAGGGGCAAT TCTTTCGGTG GCACGACATG GTTCCCTACT CCCACTTCTA
1821   CCAGGAACAG TTTAAGAATG GGATGATGCA TGGCGACAAA ATTCCTTCT ACTGCAAAA CAAGAGAG
      GGTCTTGTCT AAATCTTTAC CCTACTACGT ACCCGTGT TAAAGTGAAGA TGACGTTTTT GTTTCTCTTC
1891   AAGTGCAGCT ACACTGTGGA GGCTCATGTC AGAGATGGCA CTATCGAGAT TCCCTCGTGC TTCAGGAGC
      TTCACGTCGA TGTGACACCT CCGAGTAAAC TCTCTACCT GATAGCTCTA AGGGAGCAC AACTTCTCG
1961   ACAGTTCTCT GGCTTFTCG AAAACGGATG CATCAGAACT GACACCGTGC TGAAGTCGAA TTCATTGATC
      TGTCAAGAGA CCGAAGACC TTTTGCCTAC GTAGTCTTGA CTGTGGCAG ACTTCAGTT AAGTAACTAG
2031   ATAATCAGCC ATACCACATT TGTAGAGGTT TTACTTGTCT TAAAAAACC CCCACACCT CCCCTGAACC
      TATTAGTCGG TATGGGTGAA ACATCTCCAA AATGAACGAA ATTTTTTGGG GGGTGTGGAG GGGGACTTGG
2101   TGAAACATAA AATGAATGCA ATTGTGTGT TTAACCTTGT TATPGCAGCT TATAATGTT ACAAAATAAG
      ACTTTGTATT TCACTTACCT TAACAACAA AATTGAACAA ATAACGTCGA ATATTACAA TGTTTATTTTC
2171   CAATAGCATC ACAAAATTC AAAAAAGC ATTTTTTCA CTGCATTCTA GTGTGGTGT GTCCAAACTC
      GTTATCGTAG TGTTTAAGT GTTTATTTCC TAAAAAAGT GACGTAAGAT CAACCCAAA CAGGTTTGGAG
2241   ATCAATGTAT CTTATCATGT CTGGCGCCG CGACCTGCAG GCGCAGAACT GGTAGGTATG GAAGATCCCT
      TAGTTACATA GAATAGTACA GACCGCCGGC GCTGGACGTC CGCTCTTGA CCATCCATC CTTCTAGGGA
    
```

2311 CGAGATCCAT TGTGCTGGCG GTAGGCGGAG AGCGCCTGCC TGAAGCTGCG GCATTCCCA GTCAGAAATG
 GGTCTAGGTA ACACGACCCG CATCCGCTCG TCGCGGACCG ACTTCGACGC CCGTAAGGGT CAGTCTTTAC
 2381 AGCGCCAGTC GTCGTGGGCT CTCGGCACCG AAGTGCTATG ATTCTCCGCC AGCATGGCTT CGGCCAGTGC
 TOCGGGTCAG CAGCAGCCGA GAGCCGTGGC TTCACGATAC TAAGAGGCGG TCGTACCGRG GCCGGTCACG
 2451 GTCGAGCAGC GCCCGCTTGT TCCTGAAGTG CCAGTAAAGC GCCGGCTGCT GAACCCCAAA CCGTTCGGCC
 CAGCTCGTGC CGGGCGAACA AGGACTTCAC GGTCAATTCG CGGCCGACGA CTGGGGGTTT GGCAAGGCGG
 2521 AGITTTGGTG TCGTCAGACC GTCTACGCCG ACCTCGTTCA ACAGGTCCAG GCGGGCACGG ATCACTGTAT
 TCAAACGCAC AGCAGTCTGG CAGATGCGGC TGGAGCAAGT TGTCCAGGTC CCGCCGTGCC TAGTGACATA
 2591 TCGGCTGCAA CTTTGTCTATG CTTGACACTT TATCACTGAT AACATAATA TGTCCACCAA CTATCACTG
 AGCCGACGTT GAACAGTAC GAATGTGAA ATAGTGACTA TTTGTATTAT ACAGGTGGTT GAATAGTCAC
 2661 ATAAAGAAAT CGGCCAGCA CAATGGATCT CGAGGTCGAG GGATCTCTAG AGGATCTCT ACGCCGGACG
 TATTTCTTAG GCGCGTCTGT GTTACCTAGA GCTCCAGCTC CCTAGAGATC TCCTAGGAGA TCGCGCTGCG
 2731 CATCGTGGCC GGCATCACCG GCGCCACAGG TCGGGTGTCT GCGGCCTATA TCGCCGACAT CACCGATGGG
 TAGCACCCGG CCGTAGTGGC CGCGGTGTCC ACGCCAACGA CCGCGGATAT AGCGGCTGTA GTGGCTACCC
 2801 GAAATCGGG CTCGCCACTT CCGGCTCATG AGCGCTTGT TCGGCGTGGG TATGGTGGCA GCCCCCGTGG
 CTTCTAGCCC GAGCGGTGAA GCCCGAGTAC TCGGGAACAA AGCCGCACCC ATACCACCGT CCGGGGACCC
 2871 CCGGGGACT GTTGGGCGCC ATCTCCTTGC ATGCACCAT CTTTGGCGG CCGGTGCTCA ACGGCCTCAA
 GCGCCCTGTA CAACCCGCGG TAGAGGAACG TACGTGGTAA GGAACGCCGC CGCCACGAGT CCGCGGATT
 2941 CCFACCTACT GGCTGCTTCC TAATGCAGGA GTCCGATAAG GGAGAGGCTC GACCTCGGGC CCGGTTCTGT
 GGATGATGAC CCGACGAAGG ATTACGTCTC CAGCGTATTC CCTCTCCGAG CTGGAGCCCG GCGCAACGAC
 3011 CGGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCTGAC GAGCATCACA AAATCGACG CTCAAGTCA AGGTGGCGAA
 CGCAAAAGG TATCCGAGGC GGGGGGACTG CTCGTAGTGT TTTTAGCTGC GAGTTCAGTC TCCACCGCTT
 3081 ACCCGACAGC ACTATAAAGA TACCAGGCTT TFCGCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC
 TGGGCTGTCC TGATAATTTCT ATGGTCCGCA AAGGGGGACC TTCGAGGGAG CACGCGAGAG GACAAGGCTG
 3151 CCGTCCGCTT ACCCGATACC TGTCCGCTTC TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CCGTTTTCTA TAGCTACGC
 GGACGGCGAA TGGCCATATG ACAGCGGAA AGAGGGAAAG CCTFCGACCC GCGAAAGAGT ATCGAGTGGC
 3221 TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGTCTGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC CCGGTTCCAG
 ACATCCATAG AGTCAAGCCA CATCCAGCAA GCGAGGTTCC ACCCGACACA CGTGTCTGGG GGGCAAGTCC
 3291 CCGACCCGCTG CGCCTTATCC GGTAACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA AGACACGACT TATCGCCACT
 GGCTGGCGAC GCGGAATAGG CCTTGTATAG CAGAACTCAG GTTGGGCCAT TCTGTGCTGA ATAGCGGTGA
 3361 GCGACGAGCC ACTGGTAAAC GGATTAGCAG AGCGAGGTAT GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTGAAAGTGG
 CGCTCGCTCG TGACCATTTT CTTAATCGTC TCGCTCCATA CATCCGCCAC CATCTCCAAA GAATCTCAC
 3431 TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGAACA GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG
 ACCGGATTGA TGGCGATGTG ATCTTCTTGT CATAAACCAT AGACCGGAGA CGACTTCGGT CAATGGAAGC
 3501 GAAAAGAGT TGGTAGCTCT TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTACG GGTGGTTTTT TGTTTTCAA
 CTTTTTCTCA ACCATCGAGA ACTAGGCCGT TTGTTTGGTG GCGACCATCG CCACCAAAA AACAAAGCTT
 3571 GCAGCAGATT ACGCCAGAA AAAAAGGAT TCAGAAGAT CCTTGTATCT TTTCTAGGGG GTCTGACGCT
 CGCTGCTAA TCGCGCTCTT TTTTCTCTA AGTTCTTCTA GGAACCTAGA AAGATGCCC CAGACTGCGA
 3642 CAGTGGAAAG AAAACTCAGG TTAAGGATT TTGCTCATGA GATTATCAA AAGGATCTTC ACAGTACTCC
 GTCACCTTGC TTTTGTAGTGC AATTCCTAA AACCAGTACT CTAAATAGTT TTCTAGAGG TGGATCTAGG
 3711 TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA ACTTGGTCTG ACAGTATCCA
 AAAATTAAT TTTTACTTCA AAATTTAGTT AGATTCTATA TATACTCAT TGAACCAAG ATCCATGGT
 3781 ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA TTTCTGTCAT CCATAGTTCG CTGACTCCCC
 TACGAATTAG TCACTCCTG GATAGAGTCT CTAGACAGAT AAAGCAAGTA GGTATCAACG GACTGACGGG
 3851 GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC TTACCATCTG GCCCAGTGC TCCAATGATA CCGCGAGACC
 CAGCAGACTCT ATTTGATGCTA TGCCCTCCCG AATGGTAGAC CCGGGTCCAG ACCTTACTAT GCGCTCTGG
 3921 CACGCTCACC GGCTCCAGAT TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCGGAGGCGA GAGTGGTCC
 GTGCGAGTGG CCGAGGCTTA AATAGTCTGT ATTTGGTCCG TCGGCTTCCA CCGCTCGGCT CTTCCACAGG
 3991 GAAACTTTTA TCCGCTCCA FCCAGTCTAT TAATGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAAGTAG TTCGCCAGTT
 ACGTTGAAT AGCCGGAGGT AGGTCAAGTA ATTAACAACG GCCCTTCGAT CTCATTCATC AAGCCGTCAA
 4061 AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTTGC ACAGGCATCG TGGTGTACCG CTCGTCTGTT GGTATGGCTT
 TTATCAACCG CGTTGCAACA ACGTAAAGTA GTCCGTAGC ACCACAGTGC ACCACAGCAA CCATACCGAA
 4131 CATTACGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCATG TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG
 GTAAGTCGAG GCCAAGGGTT GCTAGTCCCG CTCAATGTAC TAGGGGGTAC AACACGTTT TTCGCCAATC
 4201 CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAAGAG TAAGTTGGCC GCAGTGTAT CACTCATGTT TATGGCAGCA
 GAGGAAGCCA GGAGGCTAGC AACAGTCTTC ATCAACCAGG CGTCAATAA GTGAGTACCA ATACCCTCGT
 4271 CTGCATAATT CTCCTACTGT CATGCCATCC GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAATAC TCAACCAAGT
 GACGTATTAA GAGAATGACA GTACGGTAGG CATCTACGAA AAAGACACTG ACCACTCATG AGTTGGTTCA
 4341 CATTCTGAGA ATAGTGTATG CCGCGACCGA GTTGTCTTG CCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC
 GTAAGACTCT TATCACATAC GCCGCTGGCT CAACGAGAAC GGGCCGCACT TATGCCCTAT TATGGCGCGG
 4411 ACATAGCAGA ACTTTAAAG TGCTCATCAT TGGAAAAGCT TCTTCGGGGC GAAACTCTC AAGGATCTTA
 TGTATCGTCT TGAAATTTTC ACGAGTAGTA ACCPTTGTCA AGAAGCCCGC CTTTTGAGAG TTTCTAGAA
 4481 CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGAC CCAACTGATC TTCAGACTCT TTTACTTTCA
 GCGGCAACT CTAGGTCAG CTACATTTGG TGAGCACGTC GGTGACTAG AAGTCGTAGA RAATGAAAGT
 4551 CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAG GGAATAGGG CGACACGGAA
 GGTGCGAAAG ACCCACTCGT TTTTGTCTT CCGTTTTACG GCGTTTTTC CCTTATTTCC GCTGTGCTTT
 4621 ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTTCA ATATTATGA AGCATTTATC AGCATTTATG AGGGTTATG TCTCATGAGC
 TACAACCTAT GAGTATGAGA AGGAAAAAGT TATAATAACT TCGTAAATAG TCCCAATAAC AGAGTACTCG
 4691 GGATACATAT TTGAATGTAT TTGAAAAAT AAACAATAG GGGTTCGCG CACATTTCCC CGAAAAGTGC
 CCTATGTATA AACTTACATA AATCTTTTTA TTTGTTTATC CCAAGGCGC GTGTAAGGG GTCTTTACG
 4761 CACCTGACGT CTAAGAAACC ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCGTATCA CGAGGCCCTG
 GTGGACTGCA GATCTTTGG TAATAATAGT ACTGTAATG GATATTTTA TCCGCTAGT GCTCCGGGAC
 4831 ATGGCTCTTT CGGGCACCA TCGTCTGTAA TGTTCCGTGG CACCGAGGAC AACCTCAAG AGAAAATGTA
 TACCGAATA CGCCGTGGGT AGCAAGCATT ACAAGGCACC GTGGCTCTG TTGGGAGTTC TCTTTTACAT
 4901 ATCACACTGG CTCACCTTCG GGTGGGCCYT TCTGCGTTTA TAAGGAGACA CTTTATGTTT AAGAAGGTTG
 TAGTGTGACC GAGTGAAGC CCACCCGAA AGACGCAAT ATTCCTCTGT GAAATACAAA TTCTTCCAAC

4971 GTAAATTCCT TCGGGCTTTG GCAGCCAAAGC TAGATCCGGC TGTGGAAATGT GTGTCAGTTA GGGTGTGGAA
 CATTTAAGGA ACGCCGAAAC CGTCGGTFCG ATCTAGGCCG ACACCTTACA CACAGTCAAT CCCACACCTT
 5041 AGTCCCAGG CTCCCAGCA GGCAGAAGTA TGCAAAGCAT GCATCTCAAT TAGTCAGCAA CCAGGTGTGG
 TCAGGGGTCC GAGGGGTCCG CCGTCTTCAT ACGTTTCGTA CGTAGAGTTA ATCAGTCCGT GGTCCACACC
 5111 AAAGTCCCA GGTCCCCAG CAGGCAGAAG TATGCCAAAG ATGCATCTCA ATTAGTCAGC ACCATAGTC
 TTTAGGGGT CCGAGGGGTC GTCCGCTTC ATACGTTTCG TACGTAGAGT TAATCAGTCC TTGGTATCAG
 5181 CCGCCCTAA CTCCGCCAT CCGCCCTTA ACTCCGCCCA GTTCCGCCCA TTCTCCGCC CATGGCTGAC
 GCGGGGATT GAGCGGGTA GGGCGGGAT TGAGCGGGT CAAGCGGGT AAGAGCGGG GTACCGACTG
 5251 TAATTTTTT TATTTATGCA GAGCCGAGG CCGCCTCGGC CTCTGAGCTA TTCCAGAAGT AGTGAGGAGG
 ATTAARAAA ATAAATACGT CTCCGGCTCC GCGGGAGCCG GAGACTCGAT AAGGTCTTCA TCACTCCTCC
 5321 CTTTTTGGG GGCCTAGGCT TTTGCAAAA GCTAGCTTGG GGCCACCGCT CAGAGCACCT TCCACCATGG
 GAAAAACCT CCGGATCCGA AAACGTTTTT CGATCGAACC CCGGTGGCGA GTCTCGTGGG AGGTGGTACC
 5391 CCACCTCAGC AAGTTCCAC TTGAACAAA ACATCAAGCA AATGTACTTG TGCCCTGCCC AGGTGTAGAA
 GGTGGAGTCG TTCAGGGTG AACTTGTTTT TGTAGTTCGT TTACATGAAC ACGGACGGGG TCCCCTCTT
 5461 AGTCCAAGC ATGTATATG GGTGTATGG TACTGGAGAA GGACTGCGCT GCAAAACCCG CACCCTGGAC
 TCAGGTTCGG TACATATAGA CCCAACTAG ATGACCTCTT CTGACCGCA CGTTTTGGCC GTGGGACCTG
 5531 TGTGAGCCCA AGTGTCTAGA AGAGTTACCT GAGTGGAAAT TTGATGGCTC TAGTACCTTT CAGTCTGAGG
 AACTCCGGT TCACACATCT TCTCAATGGA CTCACCTTAA AACTACCGAG ATCATGGAAA GTCAGACTCC
 5601 GCTCCAACG TGACATGTAT CTCAGCCCTG TTGCCATGTT TCGGGACCCC TTCCCGCAGG ATCCCAACAA
 CGAGGTGTGC ACTGTACATA GAGTCCGGAC AACCGTACAA AGCCCTGGGG AAGCGCTCTC TCCGTTGTT
 5671 GCTGTGTTC TGTGAAGTTT TCAAGTACAA CCGGAAGCCT GCAGAGACCA ATTTAAGGCA CTCGTGTAAA
 CGACCACAAG AACTTCAAA AGTTCATGTT GGCCTTCGGA CGTCTCTGGT TAAATCCCTG GAGCACATTT
 5741 CGGATAATGG ACATGGTGG CAACCAGCTC CCCTGGTTTG GAATGGAACA GGATATATCT CTGATGGGAA
 SCTATTACC TATACCCTC GTTGGTCTGT GGGACCAAAC CTTACCTTGT CCTCATATGA GACTACCCTT
 5811 CAGATGGGCA CCTTTTGTG TGGCCTTCCA ATGGCTTTC TGGGCCCAA GGTCCGTATF ACTGTGGTGT
 GTCTACCCGT GGGAAARCCA ACCGGAAGGT TACCGAAAGG ACCCGGGGTT CCAGGCATAA TGACACCACA
 5881 GGGCGCAGAC AAGCCCTATG GCAGGGATAT CGTGGAGGCT CACTACCGCG CCTGCTTGTG TGCTGGGGTC
 CCGCGCTCTG TTTCCGATAC CGTCCCTATA GCACCTCCGA GTGATGGCGC GGACGAACAT ACGACCCCA
 5951 AAGATTACG GAACAAATGC TGAGGTCATG CCTGCCAGT GGGAACTCCA AATAGGACCC TGTGAAGGAA
 TTCTAATGTC ATTGTTTACG ACTCCAGTAC GGACGGGTCA CCCTTGAGGT TTACTCTGGG ACTCTCCTT
 6021 TCCGATGGG AGATCATCTC TGGGTGGCCC GTTTCATCTT GCATCGASTA TGTGAAGACT TTGGGGTAA
 AGCGGTACCC TCTAGTAGAG ACCCACGGGG CAAAGTAGAA CGTAGCTCAT ACACTTCTGA AACCCCATTA
 6091 AGCAACCTTT GACCCCAAGC CCATTCCTGG GAACTGGAAT GGTGCAGGCT GCCATACCAA CTTTAGCACC
 TCGTTGGAAA CTGGGGTTCG GGTAAAGGACC CTTGACCTTA ACACCTCCGA CGGTATGGTT GAAATCGTGG
 6161 AAGGCCATGC GGGAGGAGAA TGGTCTGAAG CACATCGAGG AGGCCATCGA GAACTAAGC AAGCGGCACC
 TTCCGGTACG CCTCCTCTT ACCAGACTTC GTGTAGCTCC TCCGGTAGCT CTTTGATTCTG TTCGCCGTG
 6231 GGTACCACAT TCGAGCCTAC GATCCCRAAG GGGCCTGGA CAATGCCCGT GGTCTGACTG GPTCCACGA
 CCATGGTGTG AGTCCGGATG CTAGGGTTC CCTCCGACCT GTTACGGGCA CCGACTGAC CCAAGGTGCT
 6301 AACGTCCAAC ATCAACGACT TTCTGTCTGG TGTGCCAAT CGCAGTGCBA GCATCCGCA TCCCGGACT
 TTGCGAGTTC TAGTGTCTGA AAAGACGACC ACAGCGGTTA CCGTCCGGT CGTAGGCGTA AGGGCCCTGA
 6371 TCGGGCCAGG AAGAAGAAAG TTACTTTGAA GACCAGCGGC CCTCTGCCAA CCTCTGCTT TTTGACCTGA
 CAGCCGGTCC TCTTCTTTCC AATGAAACTT CTGGGCGCGG GGAGACGGTT AACACTGGGG AAACGTCACT
 6441 CAGAAGCCAT CGTCCGACCA TGCCTTCTCA ATGAGACTGG CGACGAGCCC TTCCAATACA AAACTAATT
 GTCTTCGGTA ACAGCGGTGT ACGGAGAGT TACTCTGACC GCTGCTCGGG AAGGTATGT TTTGATTA
 6511 AGACTTTGAG TGATCTTGG CCTTTCCTAG TTCATCCCAC CCGCCCCAG AGAGATCTTT GTGAAGAAC
 TCTGAAACTC ACTAGAACTC GGAAAGGATC AAGTAGGGTG GGGCGGGGTC TCTTAGAAA CACTTCTTG
 6581 CTTACTTCTG TGGTGTGACA TAATGGACA AACTACCTAC AGAGATTTAA AGCTCTAAGC TAAATATAAA
 GAATGAAGAC ACCACACTGT ATTAACCTGT TTTAGTGGATG TCTCTAAAT TCGAGATACC ATTTATATTT
 6651 ATTTTTAAGT GTATAATGTG TTAACACTACT GATTTCAAT TTTTGTGTAT TTPAGATTCC AACCTATGGA
 TAAAAATCA CATATACAC AATTTGATGC CTAAGATTA CAAACACATA AATCTAAGG TTGGATACCT
 6721 ACTGTGAAT GGGAGCAGTG GTGGAAATGC TTTAATGAGG AAAACCTGTT TTGCTCAGAA GAAATGCCAT
 TGACTACTTA CCTCGCTCAC CACTTACGG AATFACTCC TTTTGGACAA AACGAGTCTT CTTTACGTA
 6791 CTAGTATGA TGAGGCTACT GCTGACTCTC AACATTCTAC TCCFCAAAA AAGAGAGAA AGGTAGAAGA
 GATCACTACT ACTCCGATGA CGACTGAGAG TTTGATGATG AGGAGGTTTT TTCTTCTCTT TCCATCTCT
 6861 CCCCAGGAC TTTCCCTCAG AATTGCTAAG TTTTGTAGT CATCTGTGT TTAGTAATAG AACTCTGTCT
 GGGGTCTCTG AAAGGAAGTC TTAACGATTC AAAAARCTCA GTACGACACA AATCATTATC TTGAGAACGA
 6931 TGCTTTGCTA TTTACACCAC AAAGGAAAAA CACTGCACTGC TATAACAAGAA AATATGGAA AATATTTCTG
 ACGAAACGAT AAATGTGGTG TTTCTTTTTT CGACGTGACG ATATGTCTTT TTAATACCTT TTPATAAGAC
 7001 TAACCTTTAT AAGTAGGCAT AACAGTTATA ATCATAACAT ACTGTTTTTT CTTACTCCAC ACAGGCATAG
 ATTGGAATA TTCATCCGTA TTGTCAATAT TAGTATTTGA TGACAAAAAA GAATGAGGTG TGTCCGTATC
 7071 AGTGTCTGCT ATTAATAACT ATGCTCAAAA ATTTGTATCC TTTAGCTTTT TAATTTGTAA AGGGTTAAT
 TCACAGACGA TAATTATTGA TACGAGTTTT TAACACATGG AAATCGAAA ATTAACATTT TCCCAATTA
 7141 AAGGAATATT TGATGTATAG TGCCTTGACT AGAGATCATA ATCAGCCATA CCACATTTGT AGAGTTTTA
 TTCCTTATAA ACTACATATC ACGGAACCTGA TCTTAGTAT TAGTCCGGTAT GGTGTAACA TCTCCAAAT
 7211 CTTGCTTAA AAAACCTCCC ACACCTCCC CTGAACCTGA ACATAAAAT GAATGCAAT GTTGTGTAA
 GAACGAAAT TTTTGGAGGG TGTGGAGGGG GACTTTGGACT TTGTATTTA CTTACGTTAA CAAACAAAT
 7281 ACTTGTATT TGCAGCTTAT AATGGTTACA AATAAAGCAA TAGCATACA AATTCACAA ATAAAGCATT
 TGAACAAATA ACCTCGAATA TTACCAATGT TATTTTCGTT ATCGTAGTGT TTAAGTGTG TATTTCTGTA
 7351 TTTTCACTG CATTCTAGTT GTGGTTTGT CAAACTCAC AATGTATCTT ATCATGTCTG GACTACTCTT
 AAAAAGTGRC GTAAGATCAA CACCAAACRG GTTGTAGTAG TTACATAGAA TAGTACAGAC CTAGATCGAA
 7421 CGTGTCAAGG ACGGTGACTG CAGTGAATAA TAAATGTGT GTTTGTCCGA AATACCGGTT TTGAGATTT
 GCACAGTTC TCCACTGAC GTCACTTAT ATTTTACACA CAACAGGCT TTATGGCAA AACTCTAAG
 7491 TGTCCCGAC TAATTCATG TCCCGCGATA GTGGTGTTA TCCCGATAG AGATGGCAA ATTTGAAAA
 ACAGCGGCTG ATTTAAGTAC AGCGCGCTAT CACCACAAAT AGCGGCTATC TCTACCCTA TAACTTTTT
 7561 TCGATATTTG AAATATGGC ATATTGAAA TGTCCCGGAT GTGAGTTTCT GTGTAAGTGA TATCGCCATT
 AGCTATAAAC TTTTATACCG TATAACTTTT ACAGCGGCTA CACTCAAGA CACTTACTG ATAGCGGTA

7631 TTTCCAAAAG TGATTTTTGG GCATACGCGA TATCTGGCGA TAGCGCTTAT ATCGTTACG GGGGATGGCG
AAAGGTTTTTC ACTAAAAACC CGTATGCGCT ATAGACCGCT ATCGCGAATA TAGCAATGC CCCCTACCGC
7701 ATAGACGACT TTGGTGACTT GGGCGATTCT GTGTGTCGCA AATATCGCAG TTTCGATATA GGTGACGAGC
TATCTGCTGA AACCACTGAA CCGCTAAGA CACACAGCGT TTATAGCGTC AAAGCTATAT CCCTGTCTG
7771 GATATGAGGC TATATCGCCG ATAGAGGCGA CATCAAGCTG GCACATGGCC AATGCATATC GATCTATACA
CTATACTCCG ATAFAGCGGC TATCTCCGCT GTAGTTCGAC CGGTACCAGG TTACGTATAG CTAGATATGT
7841 TTGAATCAAT ATTGGCCATT AGCCATATTA TTCATTGGTT ATATAGCATA AATCAATATT GGCTATTGGC
AACTTAGTTA TAACCCGTAA TCGGTATAAT AAGTAACCAA TATATCGTAT TTAGTTATAA CCGATAACCG
7911 CATTGCATAC GTTGTATCCA TATCATAATA TGTACATTTA TATTGGCTCA TGTCCAACAT TACCCCATG
GTACCGTATG CAACATAGGT ATAGTATTAT ACATGTAAT ATAACCGAGT ACAGGTTGTA ATGGCGGTAC
7981 TTGACATTGA TTATTGACTA GTTATTAATA GTTATTCAAT ACGGGGTCAAT TAGTTCATAG CCCATATATG
AACTGTAAT AATAACTGAT CAATAATTAT CATTAGTTAA TGCCCCAGTA ATCAAGTATC GGSTATATAC
8051 GAGTCCCGG TTACATAACT TACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCTGACCGCC CAACGACCCG CGCCCATGTA
CTCAAGGGCG AATGTATTGA ATGCCATTTA CCGGGCGGAC CGACTGGCGG GTTGTGGGG GCGGGTAACT
8121 CGTCAATAAT AACGTATGTT CCGCATGTAA CGCCAATFAG GACTTTCCAT TGACGTCAAT GGGTGGAGTA
GCAGTTATTA CTGCATACAA GGGTATCATT GCGGTTATCC CTGAAAGGTA ACTGCAGTTA CCCACCTCAT
8191 TTTACGGTAA ACTGCCCACT TGGCAGTACA TCAAGTGTAT CATATGCCAA GTACGCCCCG TATTGACGTC
AAATGCCATT FGACGGGTGA ACCGTATGT AGTTACATA GTATACGGTT CATGCCGGGG ATAACTGCAG
8261 AATGACGGTA AATGGCCCGC CTGGCATTAT GCCCATGACA TGACCTTATG TGACCTTCCG CCGCAGTATG
TTACTGCCAT TTACCGGGCG GACCGTAATA CCGGTATGT ACTGGAATAC CCTGAAAGGA TGAACCGTCA
8331 ACATCTACGT ATTAGTCAAT GCTATTACCA TGGTGTATGCG GTTTTGGCAG TACATCAATG GCGGTGGATA
TGTAGATGCA TAATCAGTAG CGATAATGGT ACCACTACGC CAAAACCGTC ATGTAGTTAC CCGCACCTAT
8401 GCGGTTTGAC TCACGGGGAT TTCCAAGTCT CCACCCCAT GACGTCAATG GGAGTTTGT TTGGCACC
CGCCAAACTG AGTGCCCTA AAGGTTTACA GGTGGGGTAA CTGCAGTTAC CCTCAACAA AACCCTGGTT
8471 AATCAACGGG ACTTTCCAAA ATGTCGTAA ACCTCCGCC CATTGACGCA AATGGGGCGT AGGCGTGTAC
TTAGTTGCCG TGAAGGTTT TACAGCATTG TTGAGCGGG GTAACCTGCGT TTACCCGCA TCCCGCAGT
8541 GGTGGGAGCT C/TATATAAGC AGAGCTCGTT TAGTGACCG TCAGATCGCC TGGAGACGCC ATCCAGCCTG
CCACCCTCCA GATATATTG TCTCGAGCAA ATCACTTGGC AGTCTAGCGG ACCTCTGCGG TAGGTGCGAC
8611 TTTTGACCTC CATAGAAGAC ACCGGGACCG ATCCAGCCTC CGCGGGCGGG AACGTGCAAT TGGAACGCGG
AAAACCTGGG GTATCTTCTG TGGCCCTGGC TAGGTGCGAG GCGCCGGCCC TTGCCACGTA ACCTTGGCGC
8681 ATTCCCCCTG CCAAGAGTGA CGTAAGTACC GCCTATAGAG TCTATAGGCC CACCOCCTTG GCTTCTTATG
TAAGGGGCAC GGTCTCACT GCATTTCATG CGGATATCTC AGATATCCGG GTGGGGGAAC CGAAGATAC
8751 CATGCTATAC GTTTTTGGC TTGGGGTCTA TACACCCTCG CTTCCTCATG TTATAGGTEA TGGTATAGCT
GTAGGATATG ACAAACCCG AACCCAGAT ATGTGGGGG GAAGGAGTAC AATATCCACT ACCATATCGA
8821 TAGCCTATAG GTGTGGGTTA TTGACCATA TTGACCACTC CCCTATTGGT GACGATACTT TCCATTACTA
ATCGGATATC CACACCCAAT AACTGGTAAT AACTGGTGGG GGGATAACCA CTGCTATGAA AGSTAATGAT
8891 ATCCATAACA TGGCTCTTTG CCACAACCTC CTTTATTGGC TATATGCCAA TACACTGTCC TTCAGAGACT
TAGGTATTGT ACCGAGAAAC GGTGTGAGA GAAATACCG ATATACGGTT ATGTGACAGG AAGTCTCTGA
8961 CACACGGACT CTGTATTTT ACAGGATGGG GTCTCATTTA TTATTTACAA ATTACATAT ACAACACCAC
CTGTGCCTGA GACATAAAAA TGTCTACCC CAGAGTAAAT AATAAATGTT TAAGTGATA TGTGTGGTG
9031 CGTCCCAGT GCCCGCAGT TTTATTAAAC ATAACGTGG ATCTCCACGC GAATCTCGGG TACGTGTCC
GCAGGGGTCA CCGGCGTCAA AAATAATTTG TATTGCACCC TAGAGGTGCG CTTAGAGCCC ATGCACAGG
9101 GGACATGGGC TCTTCTCCG FAGCGCGGA GCTTCTACAT CCGAGCCTG CTCCATGCC TCCAGCGACT
CCTGTACCCG AGAAGAGGCC ATCGCCGCT CGAAGATGTA GGCFCGGAC GAGGGTACGG AGGTGCGTGA
9171 CATGGTCTGCT CGGCAGCTCC TTGCTCCTAA CAGTGGAGGC CAGACTTAGG CACAGCACGA TGCCACCAC
GTACCAGGCA GCCGTCGAG AACGAGGAT GTCACCTCCG GTCTGAATCC GTGTGCTGCT ACGGGTGGTG
9241 CACCAAGTG CCGCACAAAG CCGTGGCGGT AGGGTATGTG TCTGAAAATG AGCTCGGGGA GCGGGCTTGC
GTGGTCACAC GCGGTGTTC GGCACCGCCA TCCCATACAC AGACTTTTAC TCGAGCCCT CGCCGGAACG
9311 ACCGCTGAC CATTTGGAAG ACTTAAGCA CCGGCAGAAG AAGATGCAGG CAGCTGAGT GTTGTGTCT
TGGCGACTGC GTAAACCTTC TGAATCCGT CGCCGCTTTC TTCTACGTCC GTCGACTCAA CAACACAAGA
9381 GATAAGAGTC AGAGGTAAT CCCGTTGCGG TGCTGTAAAC GGTGGAGGGC AGTGTAGTCT GAGCAGTACT
CTATTCTCAG TCTCCATTEA GGGCAACGCC ACGACAATTG CCACCTCCCG TCACATCAGA CTCGTCATGA
9451 CGTTGCTGCC GCGCGCGCCA CCACACATAA TAGCTGACAG ACTAACAGAC TGTTCTTTC CATGGGTCTT
GCAACGACGG CCGCGCGGT GGTCTGTATT ATCGACTGTC TGATTGTCTG ACRAGGAAAG GTACCCAGAA
9521 TTCTGCAGTC ACCGTCCTTG ACACGA
AAGACGTACG TGGCAGGAAC TGTGCT

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción que se une a fosfatidilserina, en la que dicha construcción comprende una región Fc de anticuerpo conectada operativamente a dos polipéptidos de β 2-glucoproteína I (β 2GPI); en la que cada uno de dichos polipéptidos de β 2GPI comprende al menos un dominio V intacto de β 2GPI, y en la que dicho dominio V intacto se une a fosfatidilserina cuando se conecta a dicha región Fc.
2. La construcción de la reivindicación 1, en la que cada uno de dichos dos polipéptidos de β 2GPI comprende al menos un dominio V intacto de β 2GPI y uno o más de los cuatro dominios restantes de β 2GPI.
3. La construcción de la reivindicación 2, en la que cada uno de dichos polipéptidos de β 2GPI comprende al menos un dominio V intacto de β 2GPI y el dominio I de β 2GPI.
- 10 4. La construcción de la reivindicación 2, en la que cada uno de dichos polipéptidos de β 2GPI comprende al menos el dominio IV y un dominio V intacto de β 2GPI.
5. La construcción de la reivindicación 4, en la que cada uno de dichos polipéptidos de β 2GPI comprende al menos el dominio III, el dominio IV y un dominio V intacto de β 2GPI.
- 15 6. La construcción de la reivindicación 5, en la que cada uno de dichos polipéptidos de β 2GPI comprende al menos el dominio II, el dominio III, el dominio IV y un dominio V intacto de β 2GPI.
7. La construcción de la reivindicación 6, en la que cada uno de dichos polipéptidos de β 2GPI comprende el dominio I, el dominio II, el dominio III, el dominio IV y un dominio V intacto de β 2GPI.
8. La construcción de cualquier reivindicación anterior, en la que cada uno de dichos polipéptidos de β 2GPI son polipéptidos de β 2GPI humanos.
- 20 9. La construcción de cualquier reivindicación anterior, en la que dicha región Fc de anticuerpo comprende una bisagra de anticuerpo y los dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo C_{H2} y C_{H3} .
10. La construcción de cualquier reivindicación anterior, en la que dicha región Fc de anticuerpo comprende una bisagra de anticuerpo, los dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo C_{H2} y C_{H3} y al menos uno de los dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo C_{H1} y C_{H4} .
- 25 11. La construcción de cualquier reivindicación anterior, en la que dicha región Fc de anticuerpo es una región Fc de anticuerpo humano.
12. La construcción de la reivindicación 11, en la que dicha región Fc de anticuerpo es una región Fc de un anticuerpo IgG1 (γ 1) humano.
- 30 13. La construcción de la reivindicación 11, en la que dicha región Fc de anticuerpo es una región Fc de un anticuerpo IgG3 (γ 3) humano.
14. La construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha región Fc de anticuerpo es una región Fc de anticuerpo de ratón.
15. La construcción de la reivindicación 14, en la que dicha región Fc de anticuerpo es una región Fc de un anticuerpo IgG2a (γ 2a) de ratón o IgG2b (γ 2b) de ratón.
- 35 16. La construcción de cualquier reivindicación anterior, en la que dicha región Fc de anticuerpo está conectada operativamente a dichos polipéptidos de β 2GPI por un enlace covalente directo o mediante un péptido o reticulante químico.
17. La construcción de cualquier reivindicación anterior, en la que dicha región Fc de anticuerpo está conectada operativamente a dichos polipéptidos de β 2GPI por expresión recombinante como una proteína de fusión.
- 40 18. La construcción de cualquier reivindicación anterior, en la que dicha construcción está adicionalmente conectada operativamente a al menos un primer agente biológico.
19. La construcción de la reivindicación 18, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a al menos un primer agente terapéutico.
- 45 20. La construcción de la reivindicación 19, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a un agente anticelular o citotóxico.
21. La construcción de la reivindicación 20, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a una toxina de ricina, gelonina, abrina, difteria, pseudomonas o toserina.
22. La construcción de la reivindicación 19, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a

una citocina o quimiocina.

23. La construcción de la reivindicación 22, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a IL-2, IL-12, TNF- α , un interferón o LEC.
- 5 24. La construcción de la reivindicación 19, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a un inhibidor de ATPasa de tipo V.
25. La construcción de la reivindicación 24, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a salicililhalamida, concanamicina o bafilomicina.
26. La construcción de la reivindicación 19, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a un inhibidor de la síntesis de proteínas.
- 10 27. La construcción de la reivindicación 26, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a psimberina, pederina, irciniastatina A.
28. La construcción de la reivindicación 19, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico, un agente inductor de apoptosis, un fármaco antitubulina, un inhibidor de la polimerización de tubulina, un antibiótico, un radioisótopo o un coagulante.
- 15 29. La construcción de la reivindicación 28, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a taxol, docetaxel, paclitaxel, cisplatino, gemcitabina, a una combretastatina, dolastatina, auristatina PE, doxorubicina o adriamicina.
30. La construcción de la reivindicación 28, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a un radioisótopo de arsénico.
- 20 31. La construcción de la reivindicación 28, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a un Factor Tisular truncado.
32. La construcción de la reivindicación 19, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a un agente antivírico.
- 25 33. La construcción de la reivindicación 32, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a un inhibidor nucleosídico de la transcriptasa inversa, un inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa inversa o a un inhibidor de proteasa.
34. La construcción de la reivindicación 32, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a AZT, cidofovir o ribavirina.
- 30 35. La construcción de la reivindicación 18, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a al menos un primer agente de diagnóstico, de formación de imágenes o detectable.
36. La construcción de la reivindicación 35, en la que dicha construcción está además conectada operativamente a un compuesto detectable por rayos X, a un ion radioactivo, a un isótopo de resonancia de espín magnético nuclear, a un agente CEST o paraCEST.
- 35 37. La construcción de cualquier reivindicación anterior, en la que dicha construcción se incluye en una composición farmacéutica.
38. La construcción de la reivindicación 37, en la que dicha composición farmacéutica comprende además al menos un segundo agente terapéutico.
39. La construcción de la reivindicación 38, en la que dicho al menos un segundo agente terapéutico es un agente anticanceroso, un agente antiangiogénico o un agente antivírico.
- 40 40. La construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, en la que dicha composición farmacéutica es una composición de nanopartículas, de liposomas o de liposomas furtivo.
41. La construcción de la reivindicación 40, en la que dicha composición farmacéutica es una composición de liposomas o de liposomas furtivos en la que dicha construcción está asociada operativamente con la membrana externa de dicho liposoma y en la que al menos un segundo agente terapéutico se incluye en el núcleo de dicho liposoma.
- 45 42. La construcción de cualquier reivindicación anterior, para su uso en terapia.
43. La construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, para su uso en el tratamiento o en la prevención del cáncer.

44. La construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, para su uso en el tratamiento o en la prevención de una infección o infecciones víricas.
45. Uso de una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.
- 5 46. Uso de una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección o infecciones víricas.
47. La construcción para su uso como se reivindica en la reivindicación 43, en la que dicha construcción se une a fosfatidilserina expuesta en la superficie luminal de células endoteliales de vasos sanguíneos tumorales.
- 10 48. La construcción para su uso como se reivindica en la reivindicación 43, en la que dicha construcción se une a fosfatidilserina expuesta en la superficie de células tumorales.
49. La construcción para su uso como se reivindica en la reivindicación 43, en la que la construcción es para su uso en el tratamiento o en la prevención del cáncer en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un segundo agente terapéutico o anticanceroso o para su uso en combinación con radioterapia.
- 15 50. La construcción para su uso como se reivindica en la reivindicación 44, en la que dicha construcción se une a fosfatidilserina expuesta en la superficie de células infectadas con virus.
51. La construcción para su uso como se reivindica en la reivindicación 44, en la que dicha construcción se une a fosfatidilserina expuesta en la superficie de partículas víricas.
- 20 52. La construcción para su uso como se reivindica en la reivindicación 44, para su uso en el tratamiento o en la prevención de una infección o infecciones víricas en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un segundo agente terapéutico o antivírico.
53. La construcción para su uso como se reivindica en la reivindicación 44, en la que dicha infección vírica es una infección por CMV, RSV, hepatitis, gripe, VIH, herpes, paramixovirus o adenovirus.
- 25 54. La construcción para su uso como se reivindica en la reivindicación 44, en la que dicha infección o infecciones víricas es hepatitis vírica, gripe, SIDA, neumonía vírica o enfermedad respiratoria o fiebre de Lassa.

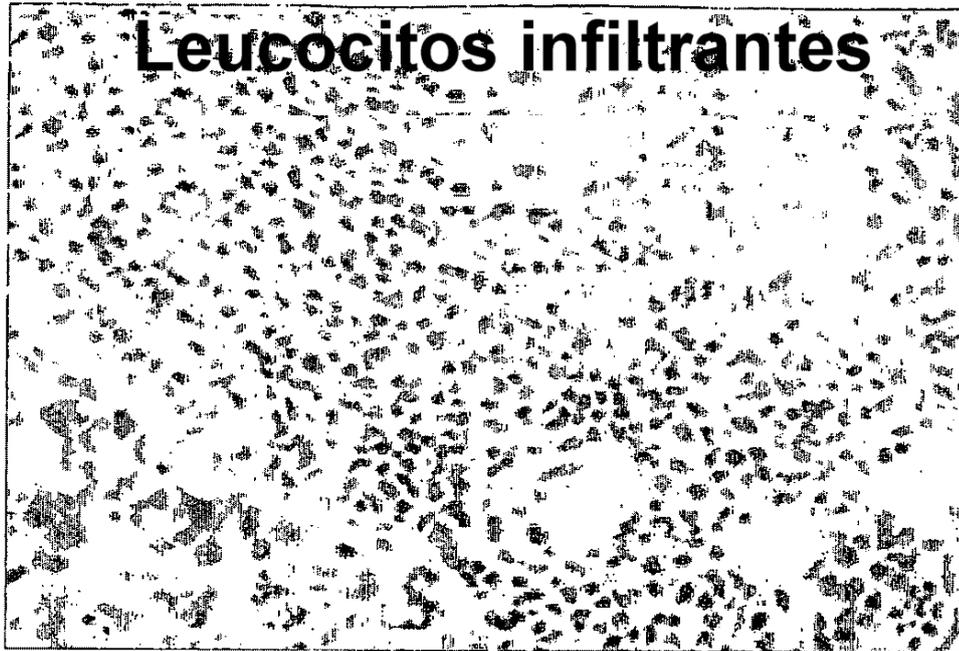


FIG. 1

FIG. 2A

Secuencia original de 3G4-2BVH

```

121      M G W T W I F I L I L S V
      ATG GGA TGG ACC TGG ATC TTT ATT TTA ATC CTG TCA GTA
      TAC CCT ACC TGG ACC TAG AAA TAA AAT TAG GAC AGT CAT
      PvuII

181      T T G V H S E V Q L Q Q S G P E L E K P
      ACT ACA GGT GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GAG AAG CCT
      TGA TGT CCA CAG GTG AGA CTC CAG GTC GAC GTC GTC AGA CCT GGA CTC GAC CTC TTC GGA
      G A S V K L S C K A S G Y S F T G Y N M

241      GGC GCT TCA GTG AAG CTA TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC TCA TTC ACT GGC TAC AAC ATG
      CCG CGA AGT CAC TTC GAT AGG ACG TTC CGA AGA CCA ATG AGT AAG TGA CCG ATG TTG TAC
      N W V K Q S H G K S L E W I G H I D P Y

301      AAC TGG GTG AAA CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT GAA TGG ATT GGA CAT ATT GAT CCT TAC
      TPG ACC CAC TTT GTC TCG GTA CCT TTC TCG GAA CTT ACC TAA CCT GTA TAA CTA GGA ATG
      Y G D T S Y N Q K F R G K A T L T V D K

361      TAT GGT GAT ACT TCC TAC AAC CAG AAG TTC AGG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAA
      ATA CCA CTA TGA AGG ATG TTG GTC TTC AAG TCC CCG TTC CGG TGT AAC TGA CAT CTG TTT
      S S S T A Y M Q L K S L T S E D S A V Y

421      TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AAG AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT
      AGG AGG TCG TGT CGG ATG TAC GTC GAG TTC TCG GAC TGT AGA CTC CTG AGA CGT CAG ATA
      Y C V K G G Y Y G H W Y F D V W G A G T

481      TAC TGT GTA AAG GGG GGT TAC TAC GGG CAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC
      ATG ACA CAT TTC CCC CCA ATG ATG CCC GTG ACC ATG AAG CTA CAG ACC CCG CGT CCC TGG
      BstEII
      ~~~~~
541      T V T V S S A T T T A P S V Y P L V P
      ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCT ACA ACA ACA GCC CCA TCT GTC TAT CCC TTG GTC CCG GGC
      TGC CAG TGG CAG AGG AGT CGA TGT TGT TGT CGG GGT AGA CAG ATA GGG AAC CAG GGC CCG
      BamHI
      EcoRI
      XhoI
      ~~~~~
601      GGA TCC CCC GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC CTC GAG GGG
      CCT AGG GGG CCC GAC GTC CTT AAG CTA TAG TTC GAA TAG CTA TGG CAG CTG GAG CTC CCC
  
```

El producto RACE 3G4-2BVH se clonó e injertó sobre la región constante $\gamma 1$ humana en el sitio BstEII. Por tanto, contiene la secuencia líder de ratón y su VH está unida con la secuencia de CH1 humana de la siguiente manera: líder/3G4VH/VSS-AST...

```

      Líder de ratón
1  MGWTWIFILI LSVTTGVHSE VQLQQSGPEL EKPGASVKLS CKASGYSFTG
51 YNMNWKQSH GKSLEWIGHI DPYYGDTSYN QKFRGKATLT VDKSSSTAYM
      ↓ Sitio de injerto BstEII
101 QLKSLTSEDS AVYYCVKGGY YGHWFYFDVWG AGTTVTVSS ASTKGPSVFPL
151 APSSKSTSG
      ↑  $\gamma 1$  CH1 humana
  
```

FIG. 2B

Secuencia original de 3G4-2BVL

```

61
                                     M D M R A
                                     ATG GAC ATG AGG GCT
                                     TAC CTG TAC TCC CGA
121  P A Q I L G F L L L L F P G T R C D I Q
    CCT GCA CAG ATT TTG GGC TTC TTG TTG CTC TTG TTT CCA GGT ACC AGA TGT GAC ATC CAG
    GGA CGT GTC TAA AAC CCG AAG AAC AAC GAG AAC AAA GGT CCA TGG TCT ACA CTG TAG GTC
181  M T Q S P S S L S A S L G E R V S L T C
    ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC TTA TCT GCC TCT CTG GGA GAA AGA GTC AGT CTC ACT TGT
    TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGG AAT AGA CGG AGA GAC CCT CTT TCT CAG TCA GAG TGA ACA
241  R A S Q D I G S S L N W L Q Q G P D G T
    CGG GCA AGT CAG GAC ATT GGT AGT AGC TTA AAC TGG CTT CAG CAG GGA CCA GAT GGA ACT
    GCC CGT TCA GTC CTG TAA CCA TCA TCG AAT TTG ACC GAA GTC GTC CCT GGT CTA CCT TGA
301  I K R L I Y A T S S L D S G V P K R F S
    ATT AAA CGC CTG ATC TAC GCC ACA TCC AGT TTA GAT TCT GGT GTC CCC AAA AGG TTC AGT
    TAA TTT GCG GAC TAG ATG CGG TGT AGG TCA AAT CTA AGA CCA CAG GGG TTT TCC AAG TCA
361  G S R S G S D Y S L T I S S L E S E D F
    GGC AGT AGG TCT GGG TCA GAT TAT TCT CTC ACC ATC AGC AGC CTT GAG TCT GAA GAT TTT
    CCG TCA TCC AGA CCC AGT CTA ATA AGA GAG TGG TAG TCG TCG GAA CTC AGA CTT CTA AAA
421  V D Y Y C L Q Y V S P P T F G A G T K
    GTA GAC TAT TAC TGT CTA CAA TAT GTT AGT TCT CCT CCC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG
    CAT CTG ATA ATG ACA GAT GTT ATA CAA TCA AGA GGA GGG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTC
                                     BbsI
                                     ~~~~~
481  L E L K R A D A A P T V F I F G G R I P
    CTG GAG CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTC TTC ATC TTC GGG CGG ATC CCC CGG
    GAC CTC GAC TTT GCC CGA CTA CGA CGT GGT TGA CAG AAG TAG AAG CCC GCC TAG GGG GCC

```

El producto RACE 3G4-2BVL se injertó sobre la región constante κ humana en el sitio BbsI. Por tanto, contiene la secuencia líder de ratón y su VL está unida con la secuencia CL1 humana de la siguiente manera: líder/3G4-VL/TVF-IFP...

```

Líder de ratón
1 MDMRAPAQIL GFLLLLFPQT RCDIQMTQSP SLSASLGER VSLTCRASQD
51 IGSSLNWLQQ GPDGTIKRLI YATSSLDLSDGV PKRFSGSRSG SDYSLTISSL
                                     FR4↓
101 ESEDFVDYYC LQYVSSPPTF GAGTKLELKR ADAAPTVE IFPPSDEQLKSGTAS
                                     ↓Sitio de injerto BbsI
                                     ↑Constante kappa humana

```

FIG. 2C

Cadena pesada de IgG2a de 3G4 (SEC ID N°: 10)

```

1 /----- Lider -----\-----
  MGWTWIFILI LSVTTGVHSE VQLQQSGPEL EKPGASVKLS CKASGYSFTG YNMNWVKQSH GKSLEWIGHI
-----VH 3G4-----\
71 DPYYGDTSYN QKFRGKATLT VDKSSSTAYM QLKSLTSEDS AVIYCVKGGY YGHWYFDVWG AGTIVTVSSA
----- dominio CH1 de IgG2a de ratón -----
141 KTTAPSVYPL APVCGDITGS SVTLGCLVKG YFPEPVLTW NSGSLSSGVH TFPVVLQSDL YTLSSSVTVT
-----\-----bisagra-----\-----
211 SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKEPRGP TIKPCPPCKC PAPNLLGGPS VFIFPPKIKD VLMISLSPIV
----- dominio CH2 de IgG2a de ratón -----
281 TCVVDVSED DFDVQISWEV NNVEVHTAQT QTHREDYNST LRVVSALPIQ HQDWMSGKEF KCKVNNKDLF
-----\----- dominio CH3 de IgG2a de ratón -----
351 APIERTISKP KGSVRAPQVY VLPPEEEMT KKQVTLTCMV TDFMPEDIYV EWTNNGKTEL NYKNTEPVLG
-----\
421 SDGSYFMYK LRVEKKNWVE RNSYSCSVVH EGLNHHHTK SFSRTFGK
  
```

FIG. 2D

Cadena ligera (C_K) de 3G4 (SEC ID N°: 11)

```

1 /----- Lider -----\-----
  MDMRAPAQIL GFLLLLFPGT RCDIQMTQSP SLSASLGER VSLTCRASQD IGSSLNLWQQ GPDGTIKRLI
----- VL 3G4 -----\-----
71 YATSSLDLGV PKRFSGSRSG SDYSLTISSL ESEDFVDIYC LQYVSSPPTF GAGTRLELKR ADAAPTVSIF
----- C-kappa de ratón -----
141 PPSSEQLTSG GASVVCFLNN FYPKDINVKW KIDGSRQNG VLNSWTDQDS KDSTYSMSST LTLTKDEYER
-----\
211 HNSYTCETH KTSTSPIVKS FNRNEC
  
```

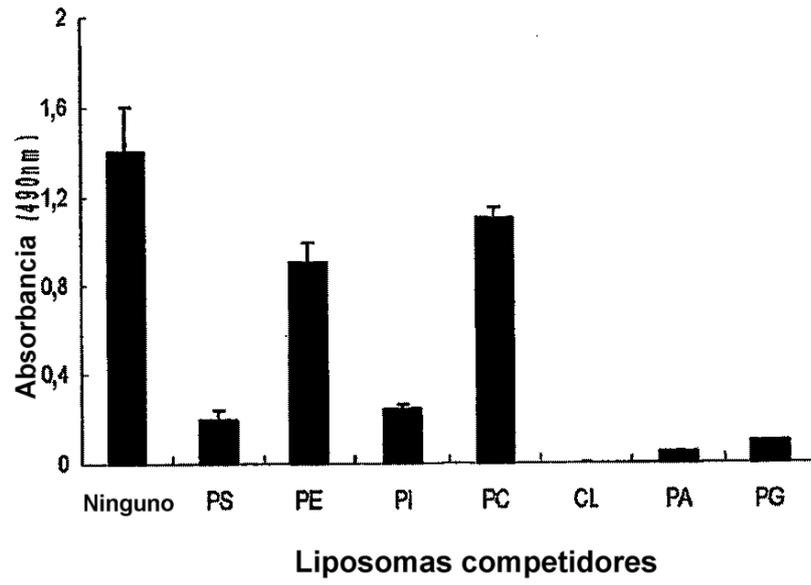


FIG. 3

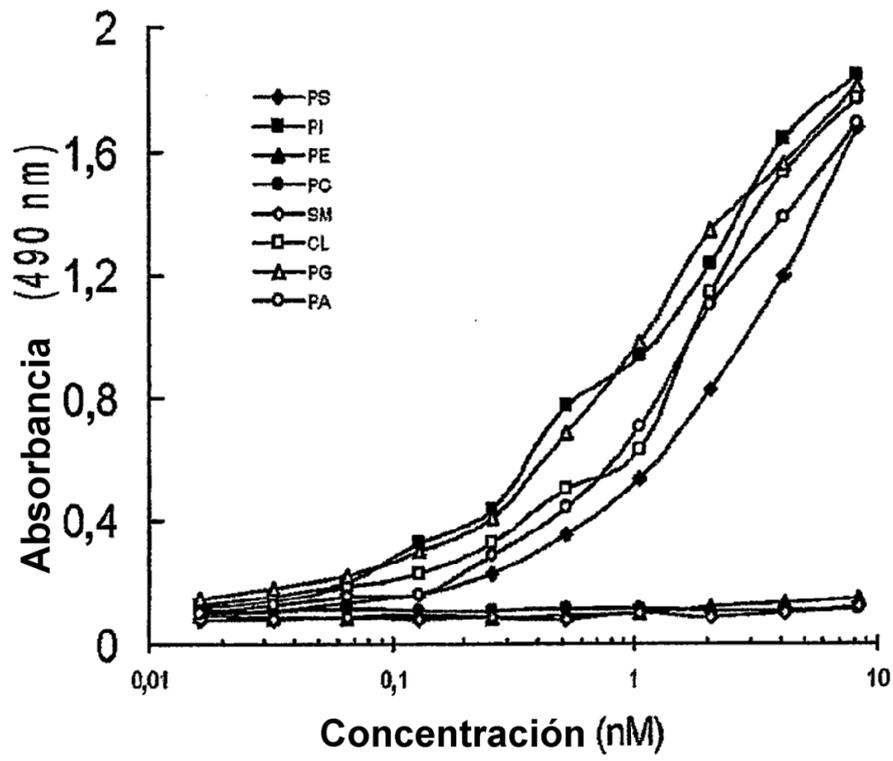
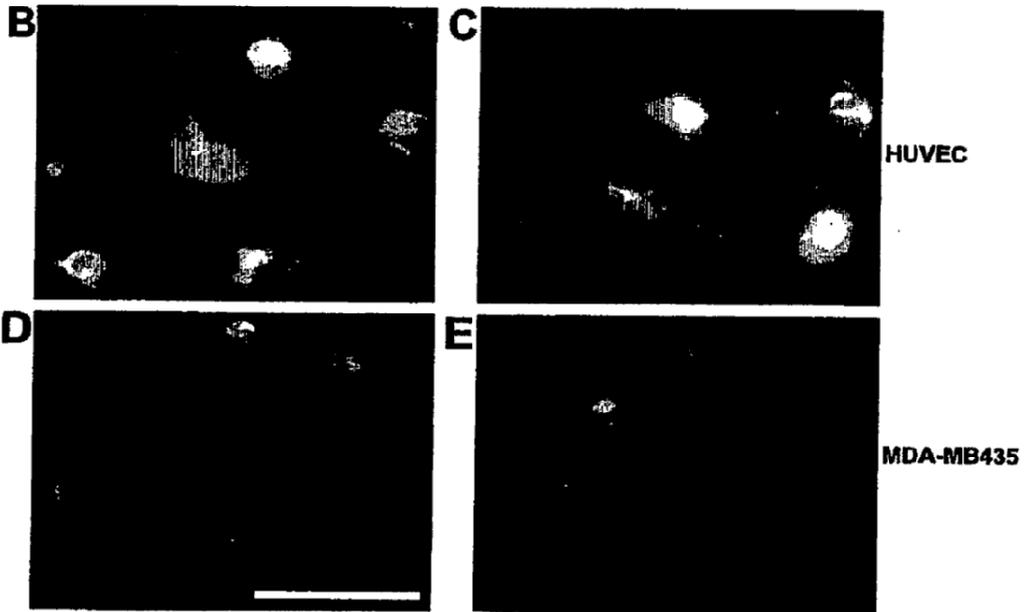
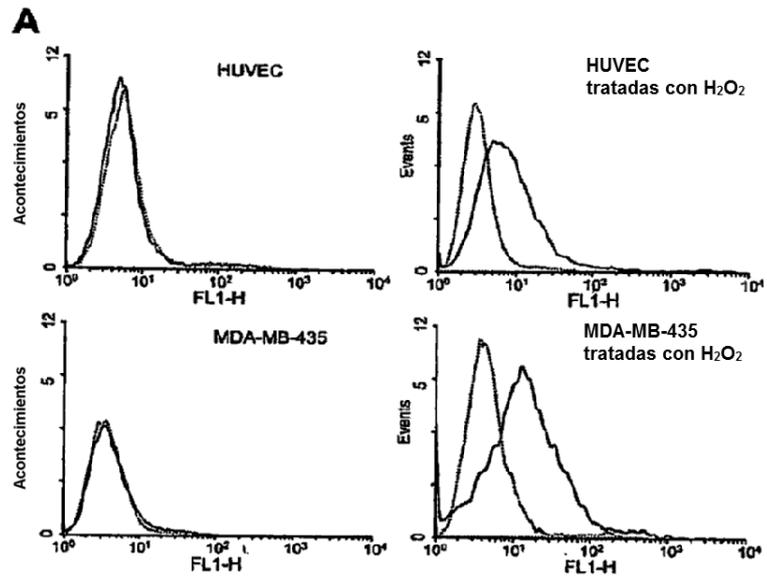


FIG. 4

FIG. 5



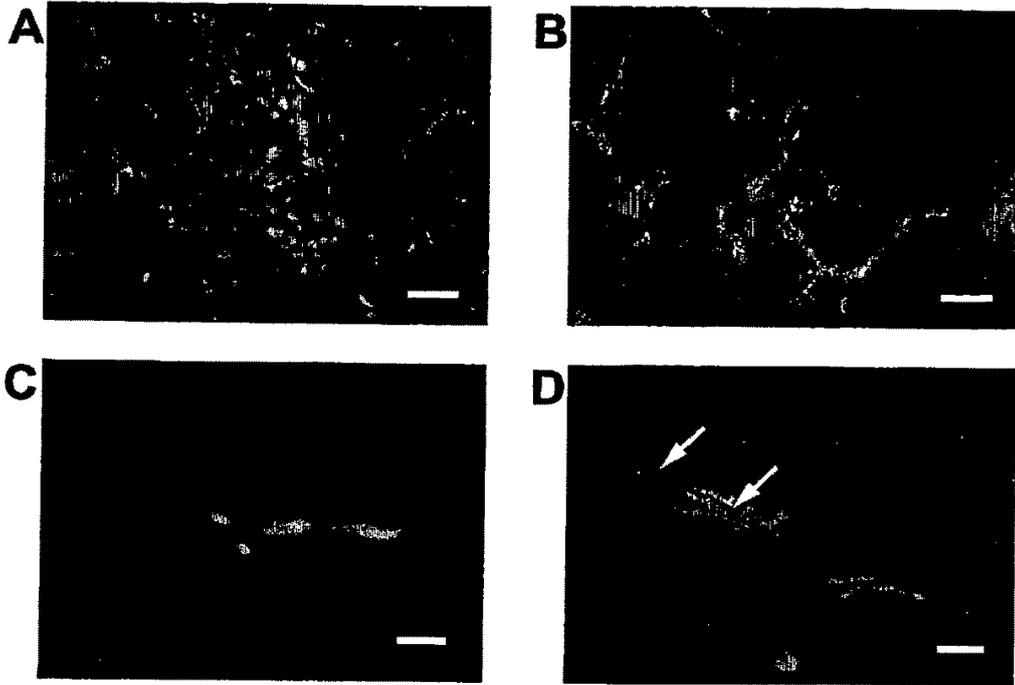


FIG. 6

LAS DOS FASES DE LA FAGOCITOSIS

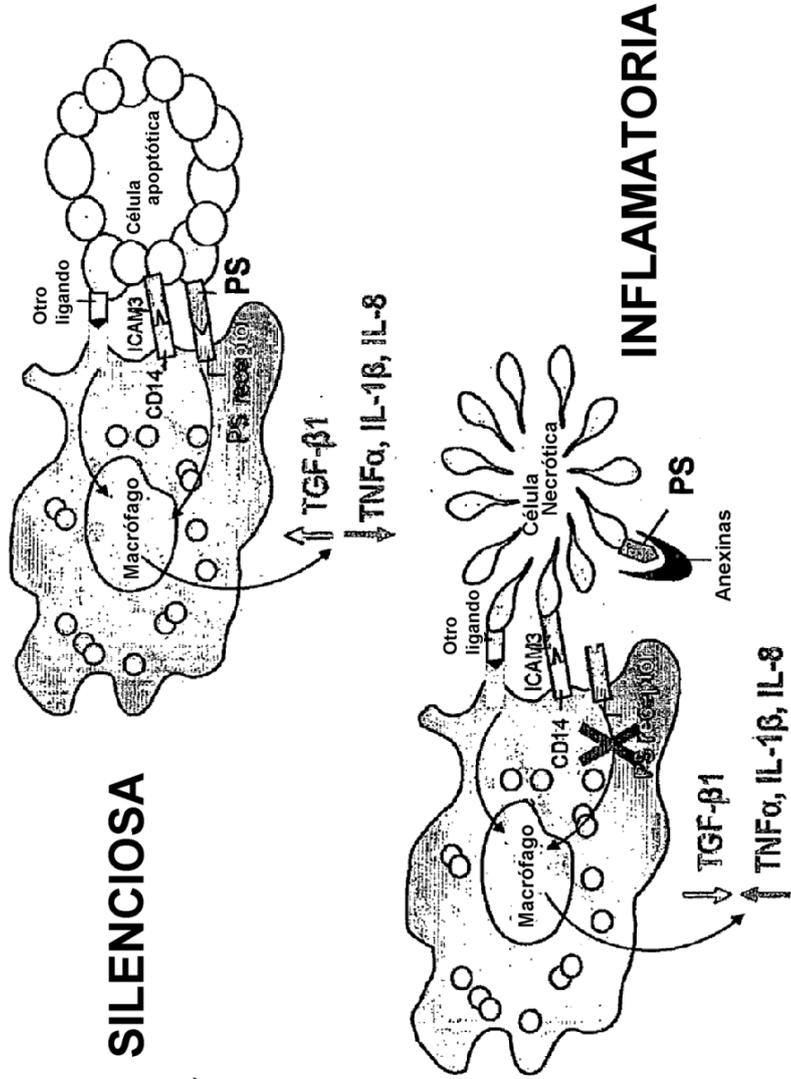


FIG. 7

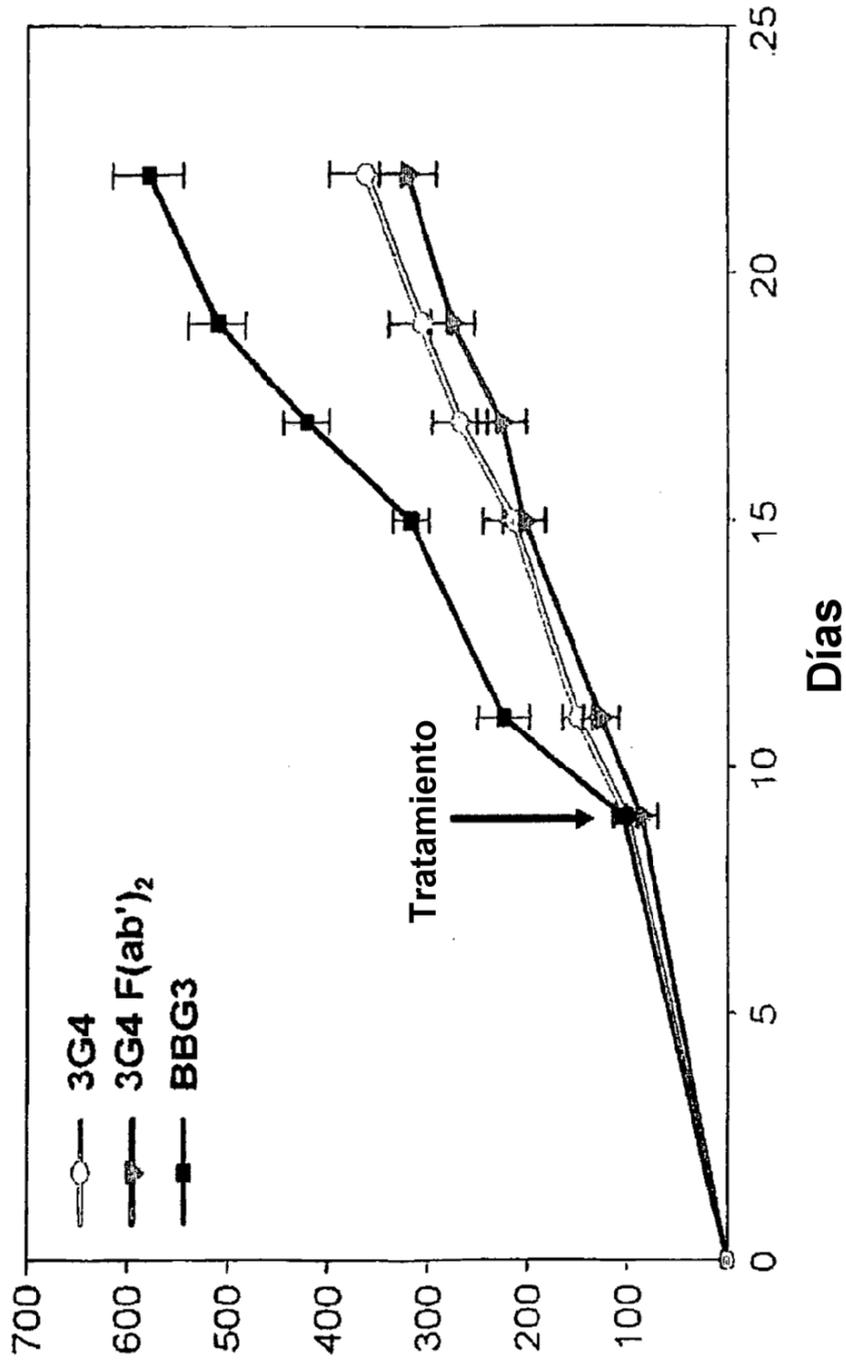


FIG. 8

FIG. 9

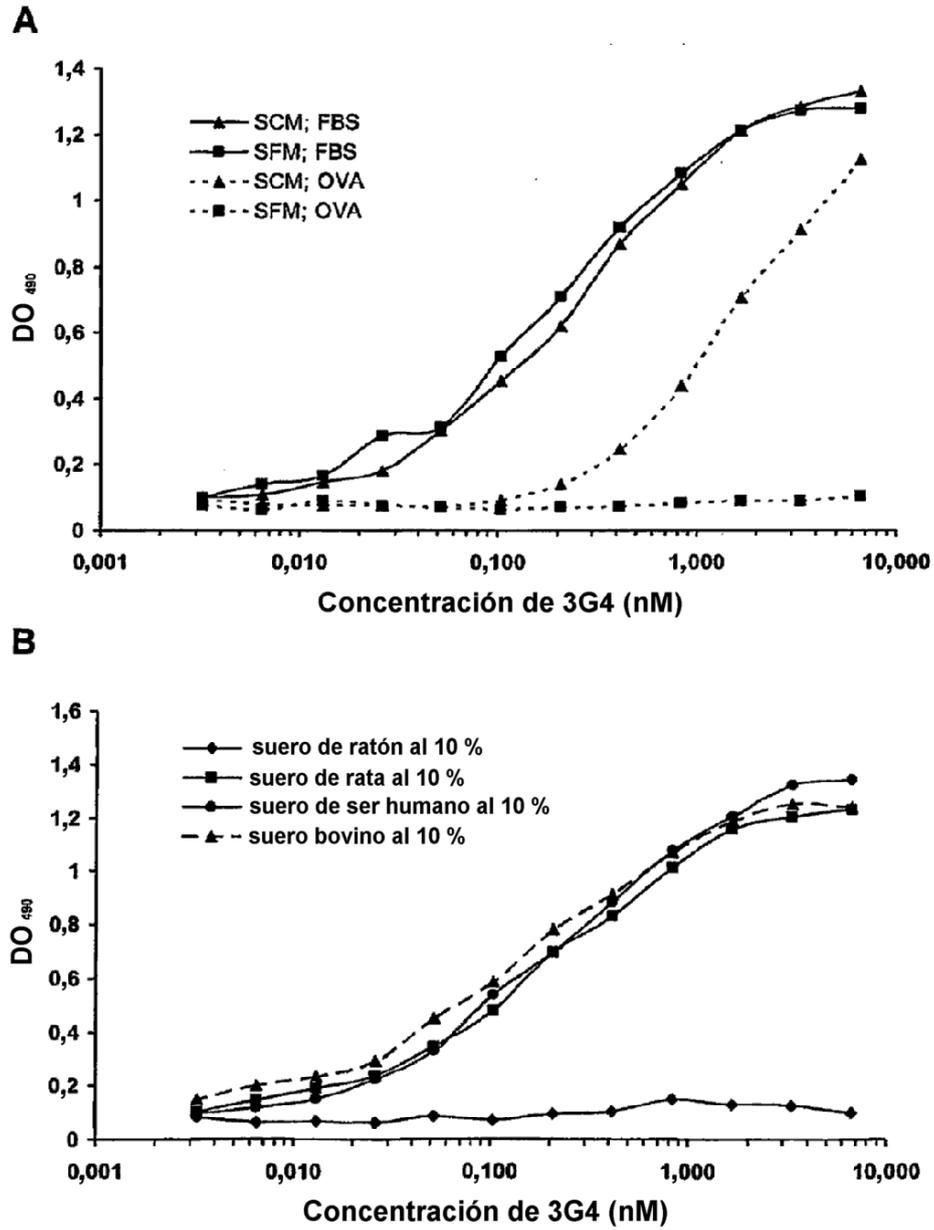
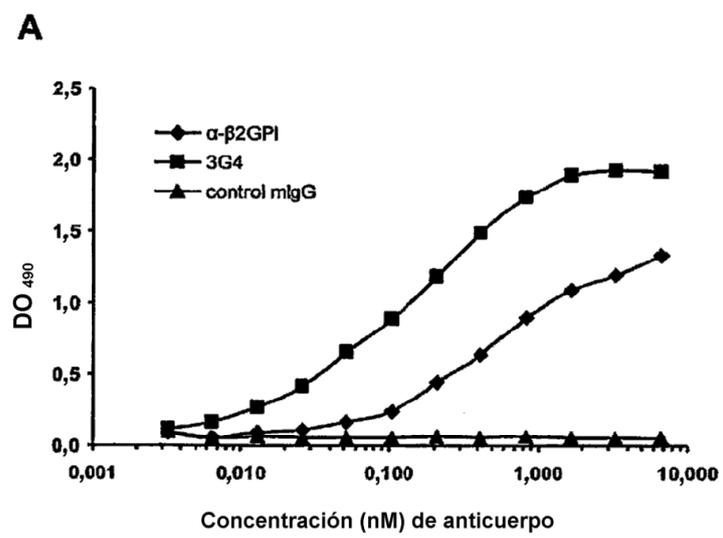


FIG. 10



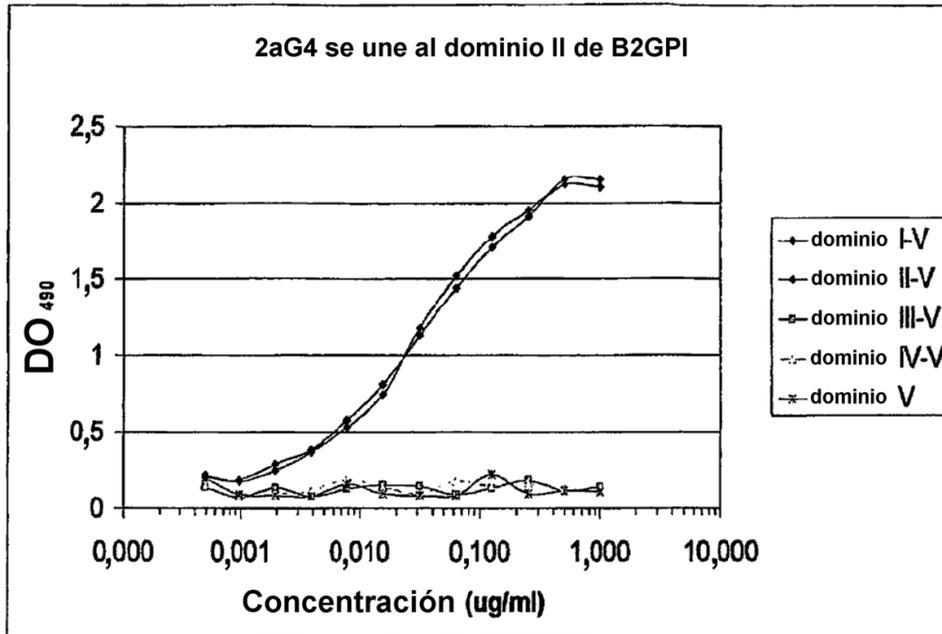


FIG. 10B

FIG. 11

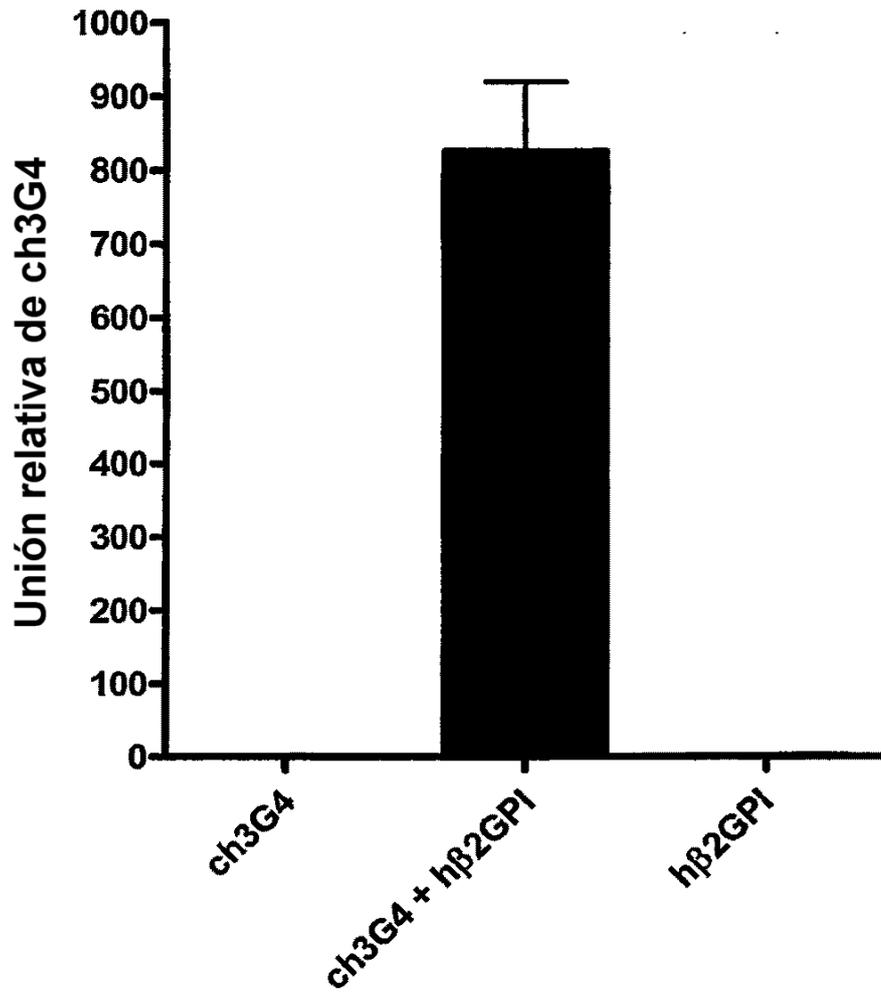


FIG. 12

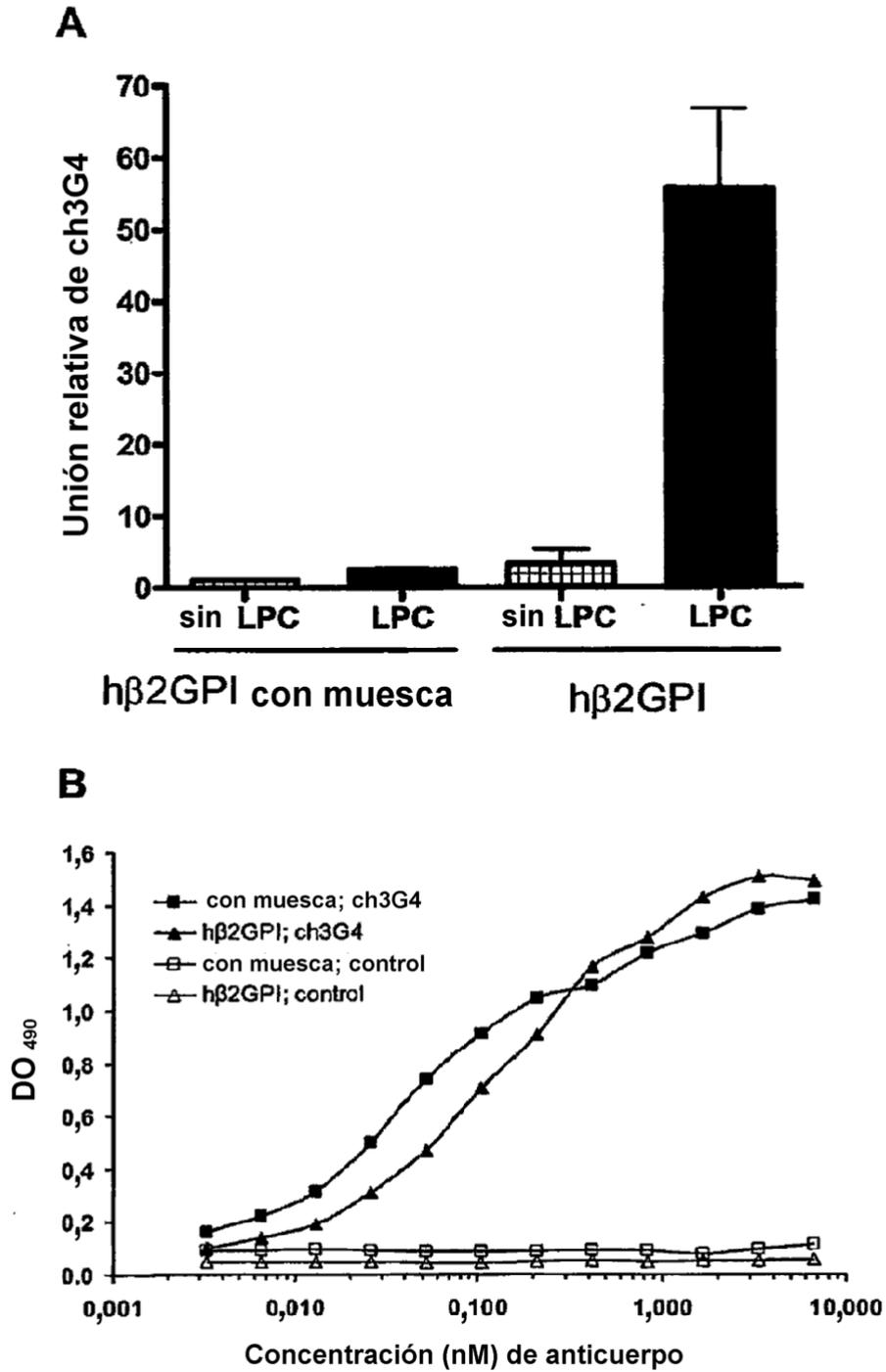


FIG. 13

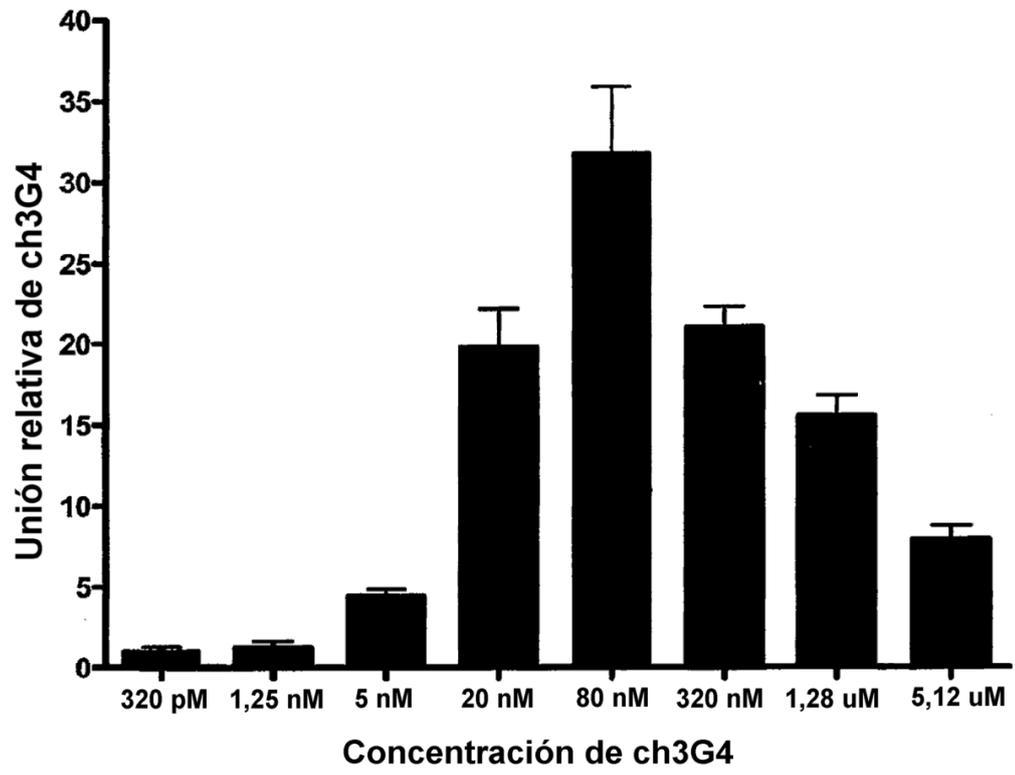
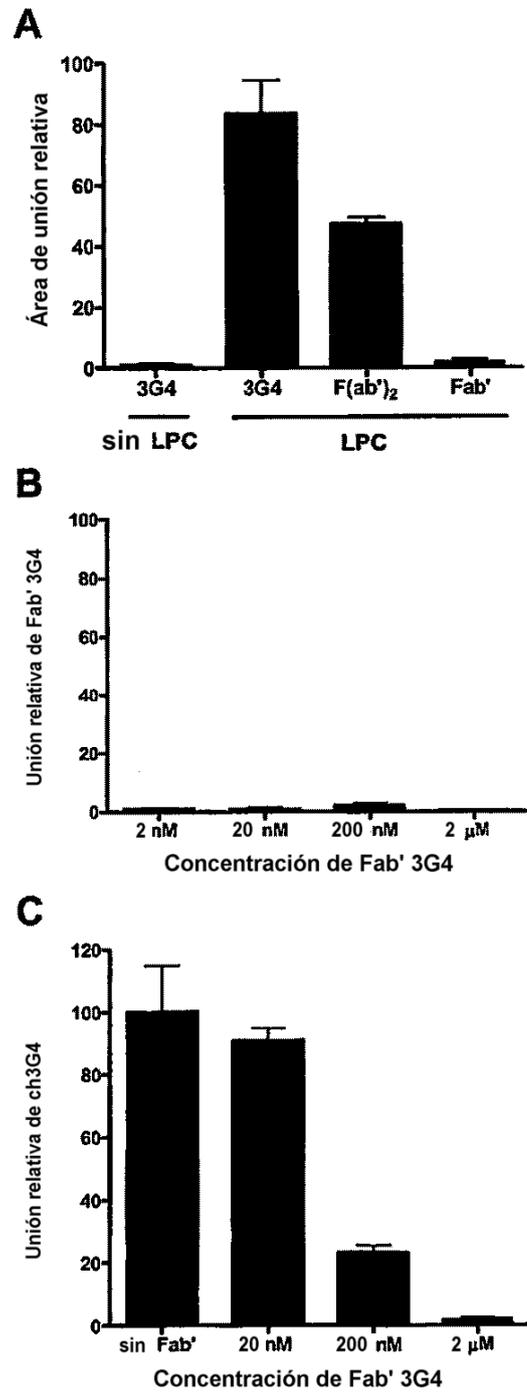


FIG. 14



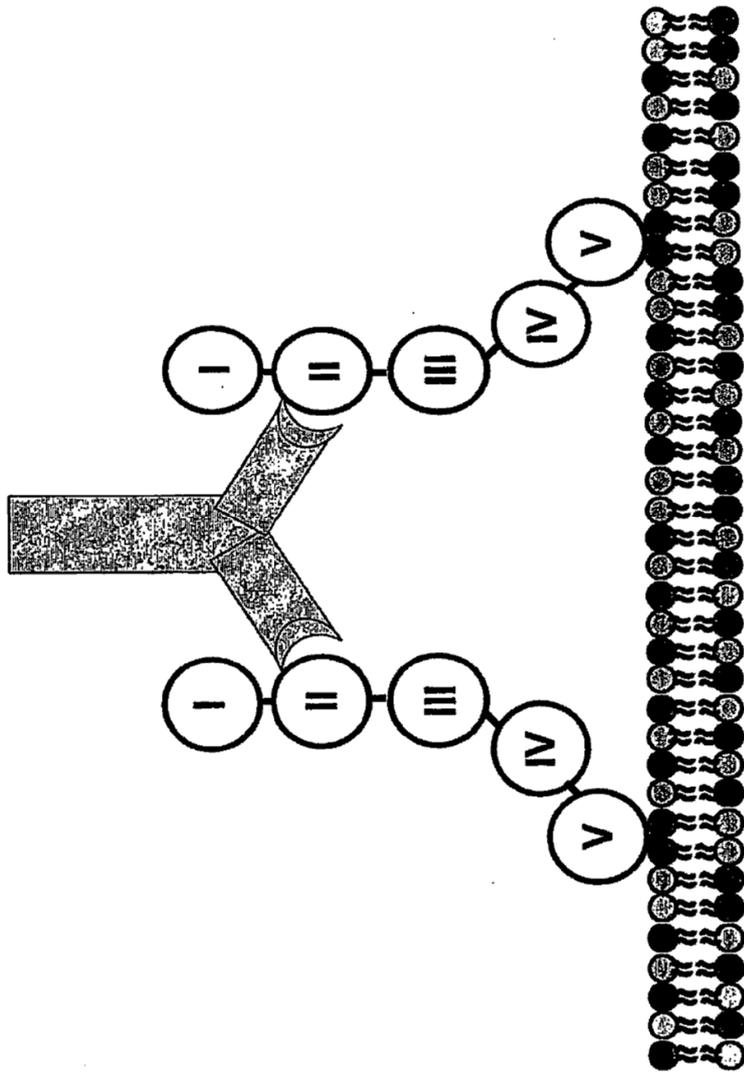


FIG. 15

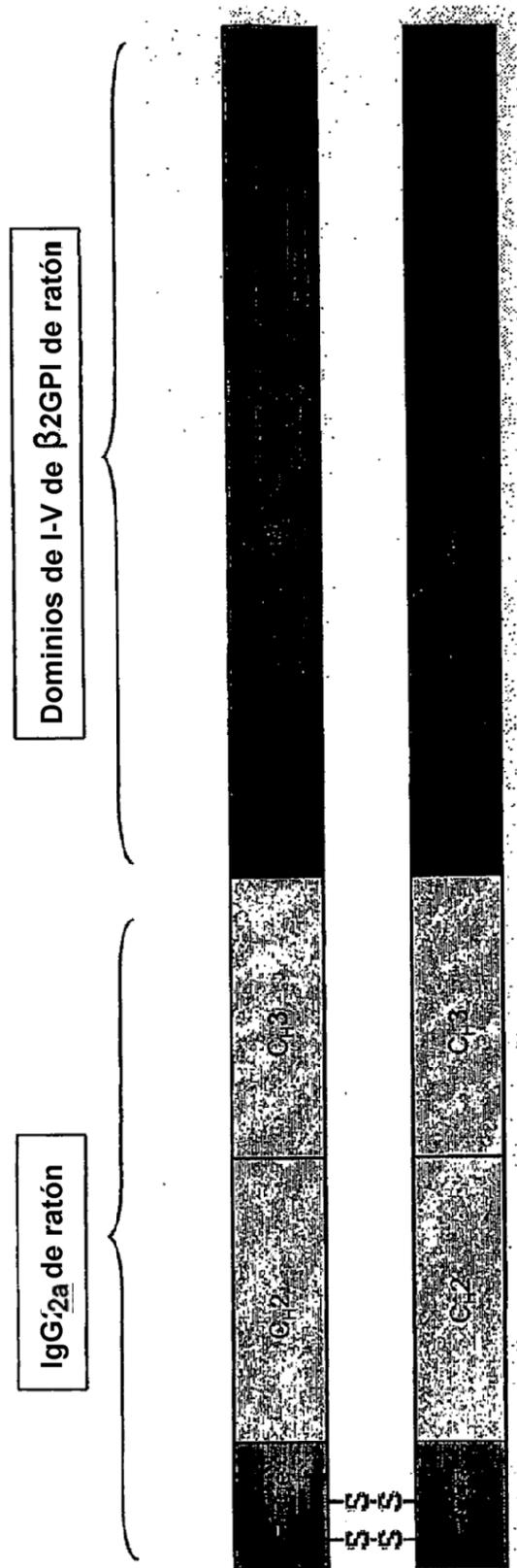


FIG. 16

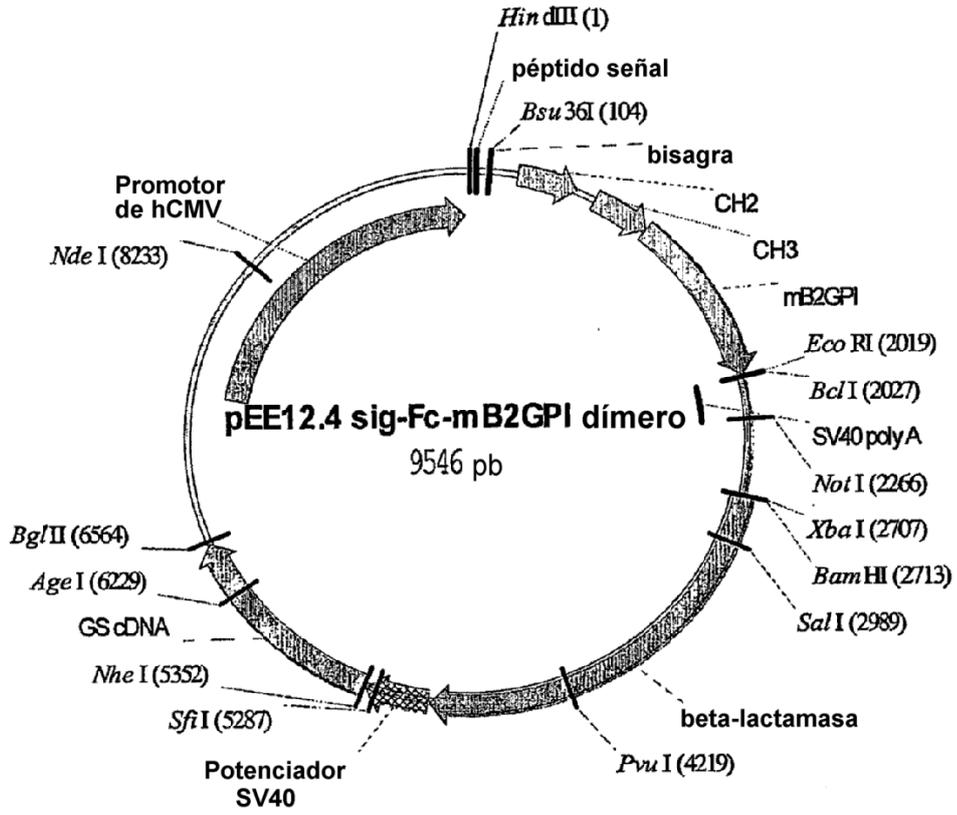


FIG. 17

FIG. 18A

Secuencia de proteína Fc-mβ2GPI

```

      1
/---secuencia señal mlgGk-----\-----bisagra-----\-----/
-24 MDMRAPAQIL GFLLLLFPFGT RCLREPRGPT IKPCPPCKCP APNLLGGPSV FIFPPKIKDV LMISLSPIVT CVVVDVSEDD
      dominio CH2 de IgG2 de ratón -----\-----/-----
56 PDVQISWFEVN NVEVHTAQTQ THREDYNSTL RVVSALPIQH QDWMSGREFK CKVNNKDLPA PIERTISKPK GSVRAPQVYV
      dominio CH3 de IgG2 de ratón -----\-----/-----
136 LPPPEEEMTK KQVTLTCMVT DEMPEDIYVE WTNNGKTELN YKNTPEVLDS DGSYFMYSKL RVEKKNWVER NSYSCSVVHE
      -----\-----/-----
216 GLHNHHTTKS FSRTFGKTGG RI1CPKDDLP FATVVELKTS YDPGEQIVYS CKPGYVSRGG MRRFT1CPLTG MWPINTLR1CV
      [----- Dominio I -----]
      -----\-----/-----
296 PRV1CFAGIL ENGIVRYTSF EYPKNISFA1 NPGFFLNGTS SSK1TEEGKW SPDIPA1CARI T1CP1PPV1PKF ALLKDYRPSA
      [----- Dominio II -----] [-----]
      -----\-----/-----
376 GNNSLYQDTV VF1CLPHFAM IGNDTV1CTE QGNWTRLPE1 LEVK1CFPPR PENGYVNYPA KPVLLYKDKA TFG1CHETYKL
      --- Dominio III -----] [----- Dominio IV -----]
      -----\-----/-----
456 DGPEEA1E1CTK TRTWSELPT1 RESCKLPVKK ATVLYQGMRV KIQEQFKNGM MHGDKIHFY1 KV1ERK1AC1SYT VEAH1CRDGTI
      [-----] [----- Dominio V -----]
      -----\-----/-----
536 EIP1CFRE1S SLAE1W1TDAS ELTP1C
      [-----]
  
```

FIG. 18B

Secuencia de proteína de la región constante de cadena pesada de IgG₁ humana:

```

/-----región CH1-----
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
-----\-----bisagra-----\-----
YICNVNKKPS NTKVDKRVEP KSCDKHTCP PCPAPPELLGG PSVFLPPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW

-----región CH2-----\-----
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDNLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE

-----región CH3-----
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPEV LDDSGSFFLY SKLTVDKSRW QGQGNVFSCSV MHEALHNHYT

-----\
QKSLSLSPG
    
```

Secuencia de proteína β 2GPI humana:

```

/-----Dominio I-----\-----
1  GRTPCPKFDL PFSTVVELKT FYEPGEEITY SCKEGYVSRG GMRRFCPLT GLWPINTLKC TPRVCPFAGI LENGAVRYTT

-----Dominio II-----\-----Dominio III-----
81  FEYFNTISFS CNTGFYLNGA DSARCTEEGK WSPFLPVCAP IICPPFSIPT FATLRVYKPS AGNNSLYRDT AVFECLPQHA

-----\-----Dominio IV-----
161  MFGNDTITCT THGNWTKLPE CREVRCPFPS RPDNGFVNYP AKPTLYYKDK ATFCCHDGYS LDGPPEIECT KLGNSAMPS

-----\-----Dominio V-----
241  CKASCKLPVK KATVVYQGER VKIQEKFRNG MLHGDKVSFF CKNKEKRCSY TEDAQCIDGT IEVPRCFKEH SSLAFWTDA

-----\
321  SDVKPC
    
```

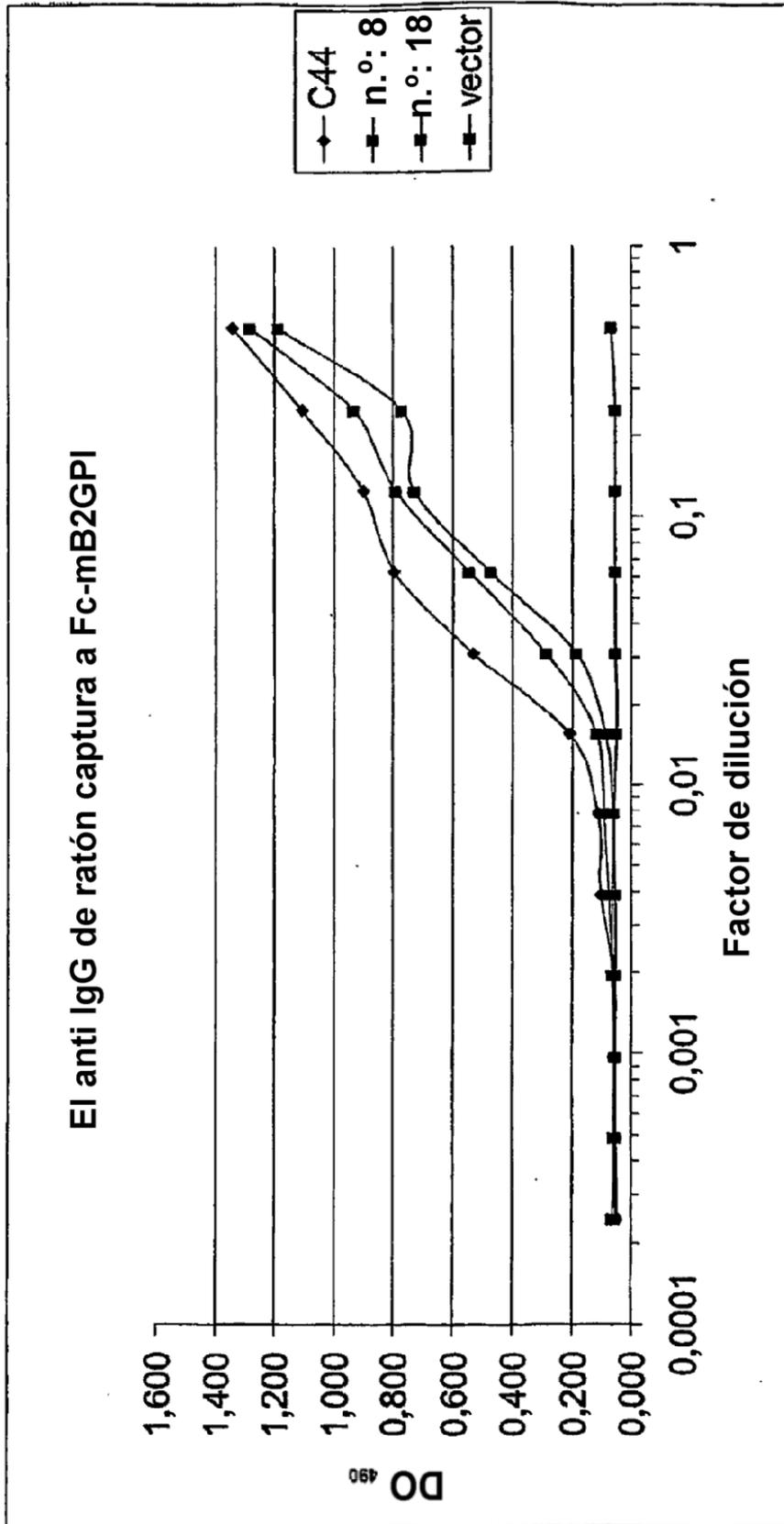


FIG. 19

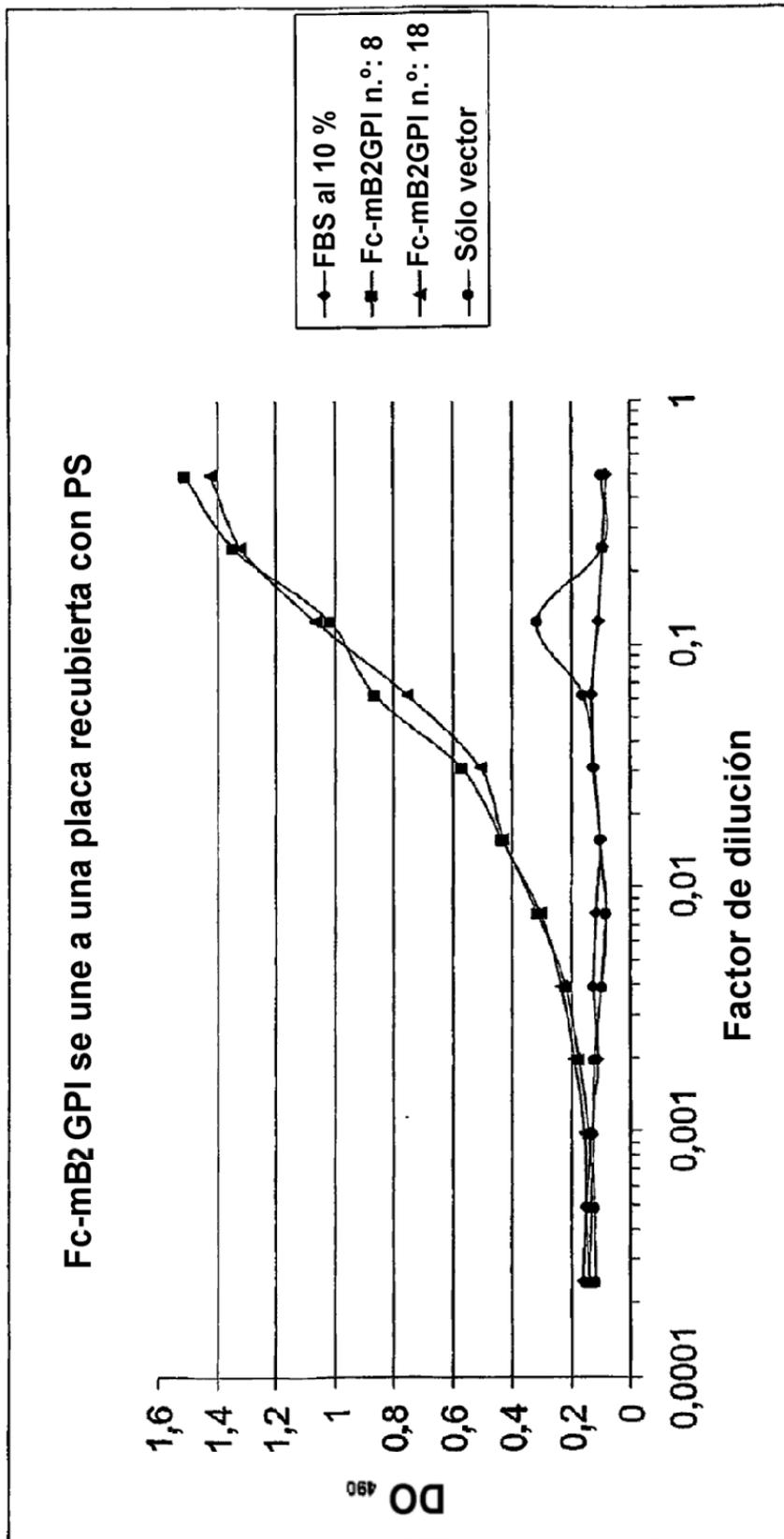


FIG. 20

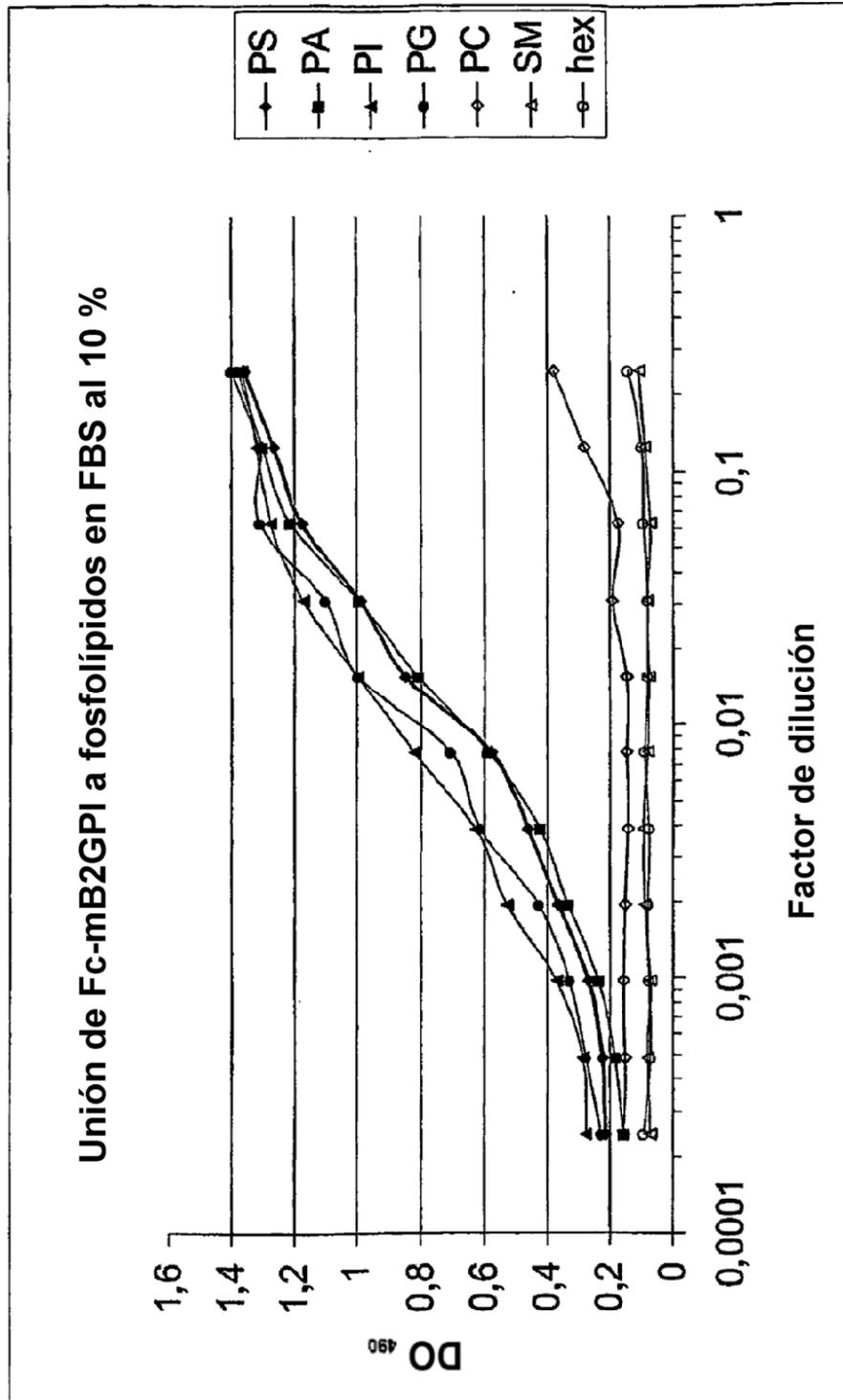


FIG. 21

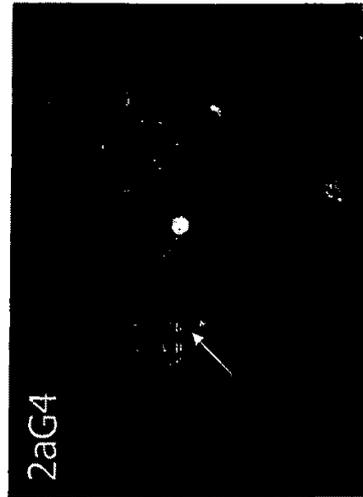


FIG. 22A

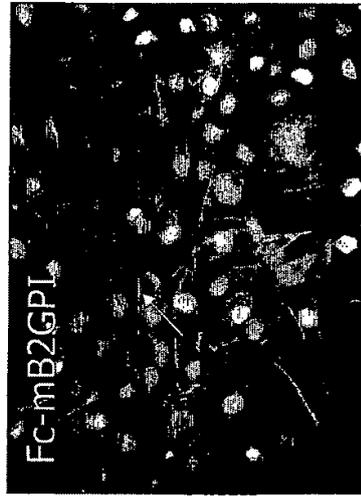


FIG. 22B

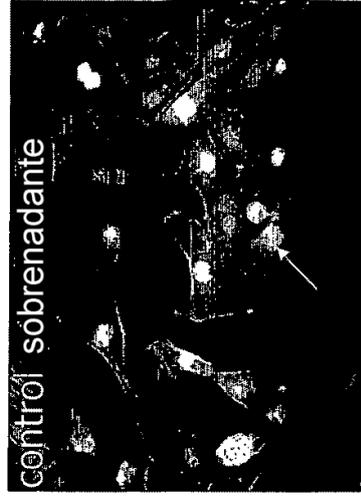


FIG. 22C



FIG. 23B

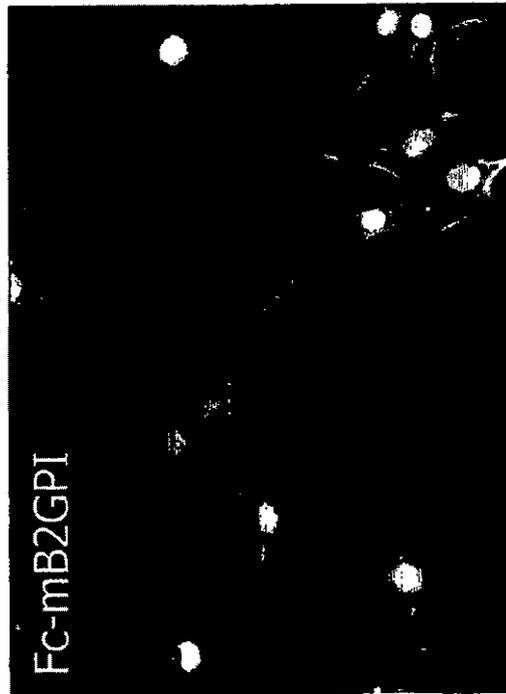


FIG. 23A

FIG. 24

