

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 451**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2007 PCT/US2007/025105**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2008 WO08073312**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2007 E 07862653 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2117571**

54 Título: **Epítipo del receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa**

30 Prioridad:

**08.12.2006 US 873627 P**  
**11.05.2007 US 930034 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.10.2017**

73 Titular/es:

**MONOPAR THERAPEUTICS INC. (100.0%)**  
**5 Revere Drive, Suite 200**  
**Northbrook, IL 60040, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**TRIGO PECES, José Ramón**

ES 2 636 451 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

Epítipo del receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un epítipo del receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR). También se divulgan anticuerpos monoclonales que se unen inmuno-específicamente a este epítipo y usos de los mismos para el tratamiento o prevención de una enfermedad, por ej., el cáncer. Estos anticuerpos pueden inhibir la interacción de complejos uPA/uPAR con otras moléculas con las que interactúan estos complejos. Los anticuerpos pueden ser utilizados en métodos terapéuticos y de diagnóstico, particularmente del cáncer.

**Estado de la técnica**

15 Un elevado volumen de pruebas procedentes de estudios in vitro e in vivo ha establecido que el sistema activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) es fundamental para el proceso de metástasis, convirtiéndolo en un objetivo prometedor para el desarrollo de medicamentos para el cáncer, (Mazar, AP et al. (1999) *Angiogenesis* 3: 15-32). Además del uPA, su receptor de la superficie celular (uPAR) es otro objetivo adecuado para el diseño y desarrollo de agentes de diagnóstico y terapéuticos para el cáncer (Mazar, AP (2001) *Anti-Cancer Drugs* 12: 397-400) porque:

(a) uPAR se expresa selectivamente en algunas células tumorales, células endoteliales angiogénicas ("ECs") y otras células asociadas a tumores, como células inflamatorias asociadas a tumores y fibroblastos asociados a tumores, pero no en la mayoría de células normales, quiescentes;

(b) uPAR es un importante participante en varias vías intracelulares y extracelulares necesarias para la metástasis que actualmente son objeto de intensos esfuerzos de desarrollo de medicamentos; y

(c) es posible interferir en varios puntos diferentes a lo largo de la vía del uPA. Por lo tanto, uPA y uPAR son objetivos prometedores para el desarrollo de terapias y diagnósticos útiles contra muchos tipos diferentes de tumores/cánceres.

30 uPAR asociado a membranas es una proteína anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Slound, E.M., *Blood* 105:1847-1848 (2005)). uPAR se compone de tres dominios; el dominio 1 (D1) es el dominio N-terminal, el dominio 2 (D2) conecta el D1 al dominio 3 (D3), y D3 es el dominio C-terminal que ancla la molécula a la membrana celular a través de un extremo GPI a Gly283 de D3 (Montuori et al., *J. Biol. Chem.* 277:46932-46939 (2002); Dano et al., *Fibrinolysis* 8:189-203 (1994)). Cuando uPAR se escinde en la molécula de anclaje GPI por la fosfolipasa C (Ploug et al., *J Biol Chem.* 266:1926-1933 (1991)) o por la fosfolipasa D, se libera de la membrana celular uPAR soluble (suPAR) (Wilhelm et al., *J. Cell Physiol.* 180:225-235 (1999)).

## El Sistema uPA/uPAR y el cáncer

40 La metástasis y la angiogénesis comparten muchas características funcionales comunes que caracterizan los procesos invasivos y migratorios de células tumorales y ECs. Estas características incluyen (1) la concentración de proteasa y expresión de integrinas, (2) la pérdida de contactos célula-célula y célula-matriz, (3) el aumento de la respuesta a factores de diferenciación y crecimiento, y (4) la remodelación de la matriz extracelular (ECM) y membrana basal (BasM). Todas ellas contribuyen a la progresión tumoral.

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

50 (1) iniciar cascadas que tienen como resultado la activación del plasminógeno, activando varias pro-metaloproteasas (proM-MPs),

(2) liberación y procesamiento de factores de crecimiento latentes como el factor-2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), y factor- $\beta$  de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ),

55 (3) (a) interacciones con componentes de ECM tales como vitronectina (Vn) y fibronectina (Fn), (b) interacciones directas con varias integrinas incluyendo  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha v\beta 3$  y (c) remodelar el BasM y ECM para promover la motilidad celular.

60 Además, el sistema uPA también puede iniciar la renovación de fibrinas localizadas que puede desempeñar un papel en la angiogénesis.

La expresión de uPA y uPAR ha sido demostrada en numerosos tipos de tumores incluyendo el glioblastoma, carcinomas celulares renales, hepatocelulares, de próstata, mama y colon (Mizukami IF et al. (1994) *Clin Immunol y Immunopathol* 71:96-104; Hsu DW et al., (1995) *Am J Pathol* 147:114-23; de Witte JH et al. (1999) *Br J Cancer* 79:1190-8). La expresión de uPA y uPAR es normalmente mayor en formas de enfermedad más agresivas. En células tumorales, esta expresión suele ser mayor en el frente invasivo del tumor (Buo, L et al., (1995) *Human Pathol*

26:1133-1138; Yamamoto M et al. (1994) *Cancer Res* 54:5016-5020). Se ha registrado una fuerte tinción inmunohistoquímica para uPAR en vasos sanguíneos asociados al frente invasivo de carcinomas celulares renales, de colon y mama (Bastholm L et al. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 7: 39-47; Nakata S et al. (1998) *Int. J. Cancer* 79:179-186). En el estudio del carcinoma de colon, uPAR se ha colocalizado con VEGF. La expresión de uPA y uPAR también ha sido observada en macrófagos asociados a tumores en varios tipos de tumores (Ohtani H et al.) (1995) *Int J Cancer* 62:691-6; Xu Y et al. (1997) *Hum Pathol* 28:206-13). uPA es quimiotáctico para monocitos y actúa de mediador tanto en la adhesión como en la migración de estas células. La adhesión y migración requieren únicamente la presencia de uPAR aunque no la actividad catalítica de uPA. Por lo tanto, se cree que el sistema uPA contribuye a la progresión tumoral actuando sobre múltiples tipos de células asociadas a tumores.

Varios estudios recientes han evaluado el potencial terapéutico de inhibir la unión de uPA a uPAR en sistemas singénicos. El suministro de un fragmento de uPA amino-terminal de murino codificado por adenovirus ("ATF" en abreviatura -- éste es el dominio de uPA que contiene la zona de unión uPAR) directamente a los tumores tuvo como resultado (a) la supresión de neovascularización y (b) detención del crecimiento del tumor (Li H et al. (1998) *Gene Ther* 5:1105-1113). Debido a la "especificidad" de la especie, cabría esperar que el ATF de murino se uniera solamente a ECs huéspedes de murino y leucocitos, no a células tumorales humanas. Ello indica que la inhibición tumoral fue propiciada por la supresión de la respuesta angiogénica del huésped. Finalmente se produjo un anticuerpo policlonal en contra de un fragmento de residuo-100 de uPAR de rata selectivamente localizado en un tumor de mama de rata que creció a partir de células de la línea celular Mat BIII (Rabbani SA et al. (2002) *Cancer Res* 62: 2390-97). Este anticuerpo policlonal inhibió completamente el crecimiento del tumor y produjo la regresión tumoral.

Lamentablemente, a pesar de la promesa de tener como objetivo el sistema uPA a efectos terapéuticos y de diagnóstico, los esfuerzos de la investigación no han tenido como resultado el desarrollo de agentes adecuados para casos clínicos. Los enfoques de moléculas pequeñas se han visto obstaculizados por (1) la dificultad de inhibir de forma potente la interacción proteína-proteína (por ej., uPA-uPAR o uPAR-integrina), y (2) la falta de pistas adecuadas o de información sobre estructuras susceptibles de conducir a desarrollos de la química medicinal. Se han identificado varios péptidos inhibidores potentes de la interacción uPA-uPAR pero se verían afectados de las normalmente malas propiedades farmacológicas de los péptidos y no han mostrado los niveles necesarios de actividad incluso en ensayos basados en células (Ploug M et al. (2001) *Biochemistry* 40:12157-68).

### Descripción breve de la invención

La presente invención se basa, en parte, en la caracterización del epítipo del anticuerpo monoclonal específico del uPAR, ATN-658. Por consiguiente, la presente invención proporciona un péptido aislado o purificado consistente en la secuencia de aminoácidos CCTKSGCNHPDLVDVQYPSG (SEQ ID NO: 9), CCTKSGCNHPDLVDVQYPS (SEQ ID NO: 10), CCTKSGCNHPDLVDVQYP (SEQ ID NO: 11), CCTKSGCNHPDLVDVQY (SEQ ID NO: 12), o CCTKSGCNHPDLVDVQ (SEQ ID NO: 13). La secuencia del epítipo también puede formar parte de una secuencia más larga, *por ej.*, 20, 25, 30, 35, 40 aminoácidos, donde la secuencia más larga es un fragmento de uPAR humano y comprende la secuencia del epítipo.

En un modo de realización, la presente invención proporciona métodos de producir un anticuerpo, que consisten en (i) inmunizar un mamífero no humano con un péptido (opcionalmente, purificado) de la invención; (ii) aislar esplenocitos de dicho mamífero; (iii) fusionar dichos esplenocitos a células de mieloma; y (iv) seleccionar un hibridoma. En otro modo de realización, la presente invención proporciona métodos de producir un anticuerpo, que consisten en (i) inmunizar un mamífero no humano con un péptido que comprende un epítipo dependiente de la conformación definido por (a) CCTKSGCNHPDLVDVQYPSG (SEQ ID NO: 9), CCTKSGCNHPDLVDVQYPS (SEQ ID NO: 10), CCTKSGCNHPDLVDVQYP (SEQ ID NO: 11), CCTKSGCNHPDLVDVQY (SEQ ID NO: 12) o CCTKSGCNHPDLVDVQ (SEQ ID NO: 13); y (b) CGSSDMSCERGRHQSL (SEQ ID NO: 14) de uPAR humano (SEQ ID NO: 15); (ii) aislar esplenocitos de dicho mamífero; (iii) fusionar dichos esplenocitos a células de mieloma; y (iv) seleccionar un hibridoma que secrete un anticuerpo que fije dicho péptido. La presente divulgación proporciona métodos de producir un anticuerpo, que comprenden (i) inmunizar un mamífero con un péptido que incluye un epítipo dependiente de la conformación definido por (a) KSGCNHPDL (SEQ ID NO: 16); y (b) CGSSDMSCERGRHQSL (SEQ ID NO: 14) de un uPAR humano (SEQ ID NO: 15); (ii) aislar esplenocitos de dicho mamífero; (iii) fusionar dichos esplenocitos a células de mieloma; y (iv) seleccionar un hibridoma que secrete un anticuerpo que fije dicho péptido. Se divulgan métodos para producir un anticuerpo, que comprenden (i) inmunizar un mamífero con un fragmento de uPAR humano (opcionalmente purificado) comprendiendo un epítipo dependiente de la conformación definido por (a) KSGCNHPDL (SEQ ID NO: 16); y (b) CGSSDMSCERGRHQSL (SEQ ID NO: 14) de un uPAR humano (SEQ ID NO: 15); (ii) aislar esplenocitos de dicho mamífero; (iii) fusionar dichos esplenocitos a células de mieloma; y (iv) seleccionar un hibridoma que secrete un anticuerpo que fije dicho péptido. En un modo de realización, los métodos de producir un anticuerpo comprenden (i) inmunizar un mamífero no humano con un fragmento de uPAR humano (opcionalmente purificado) comprendiendo los dominios 2 y 3 de uPAR humano (SEQ ID NO: 15); (ii) aislar esplenocitos de dicho mamífero; (iii) fusionar dichos esplenocitos a células de mieloma; y (iv) seleccionar un hibridoma que secrete un anticuerpo que fije dicho péptido. En otro modo de realización, los métodos de producir un anticuerpo comprenden (i) inmunizar un mamífero con un fragmento aislado de uPAR humano (SEQ ID NO: 15), en el que el extremo amino de dicho fragmento se encuentra en cualquiera de

los números aminoácidos 93-98 y el extremo carboxilo de dicho fragmento se encuentra en cualquiera de los aminoácidos 279-283, o un derivado de los mismos conteniendo solamente sustitutos conservadores relativos a la secuencia de dicho fragmento; (ii) aislar esplenocitos de dicho mamífero; (iii) fusionar dichos esplenocitos a células de mieloma; y (iv) seleccionar un hibridoma que secreta un anticuerpo que fije dicho fragmento. Un mamífero no humano puede ser un ratón, conejo, cabra, rata, gato, perro, etc. La invención también comprende métodos de producir un anticuerpo utilizando expresión en fago.

La presente divulgación presenta anticuerpos o fragmentos fijadores del antígeno de los mismos, que se fijan inmuno-específicamente a un epítipo definido por la secuencia de aminoácidos CCTKSGCNHPDLVDVQYPSG (SEQ ID NO: 9), CCTKSGCNHPDLVDVQYPS (SEQ ID NO: 10), CCTKSGCNHPDLVDVQYP (SEQ ID NO: 11), CCTKSGCNHPDLVDVQY (SEQ ID NO: 12) o CCTKSGCNHPDLVDVQ (SEQ ID NO: 13). Se divulgan anticuerpos o fragmentos fijadores del antígeno de los mismos, que se fijan inmuno-específicamente a un epítipo definido por la secuencia de aminoácidos KSGCNHPDL (SEQ ID NO: 16). En ciertos modos de realización, mutar el epítipo en el residuo aminoácido 268 reduce o suprime la afinidad de unión inmuno-específica del anticuerpo. Debe tenerse en cuenta que todas las referencias en esta aplicación a números de aminoácidos en la secuencia uPAR humana corresponden a una numeración a partir del extremo amino del uPAR procesado, que carece de los 22 aminoácidos terminales mostrados en la Figura 1, a menos que se indique explícitamente lo contrario. También se divulgan anticuerpos, o fragmentos fijadores de antígenos de los mismos, que se unen inmuno-específicamente a un epítipo dependiente de conformación definido por (i) CCTKSGCNHPDLVDVQYPSG (SEQ ID NO: 9), CCTKSGCNHPDLVDVQYPS (SEQ ID NO: 10), CCTKSGCNHPDLVDVQYP (SEQ ID NO: 11), CCTKSGCNHPDLVDVQY (SEQ ID NO: 12) o CCTKSGCNHPDLVDVQ (SEQ ID NO: 13); y (ii) CGSSDMSRCERGRHQS (SEQ ID NO: 14) en el contexto de un uPAR humano (SEQ ID NO: 15). En algunos modos de realización, los anticuerpos o fragmentos fijadores del antígeno de los mismos, se unen inmuno-específicamente a un epítipo dependiente de conformación definido por (i) KSGCNHPDL (SEQ ID NO: 16); y (ii) CGSSDMSRCERGRHQS (SEQ ID NO: 14) en el contexto de un uPAR humano (SEQ ID NO: 15). En algunos modos de realización, la unión de un anticuerpo al epítipo se demuestra por una reducción en dicha unión por dicho anticuerpo cuando el residuo K (Lys) en la posición 268 en uPAR humano muta a un residuo E (Glu) (uPAR K268E) o a un residuo A (Ala) (uPAR K268A). De manera preferente, la cantidad de unión se demuestra por co-inmunoprecipitación del anticuerpo y uPAR K268E o uPAR K268A. En otros modos de realización, la unión de un anticuerpo al epítipo se demuestra por una reducción en dicha unión por dicho anticuerpo cuando el residuo H (Hys) en la posición 273 en uPAR humano muta a un residuo A (Ala) (uPAR H273A). De manera preferente, la cantidad de unión se demuestra por co-inmunoprecipitación del anticuerpo y uPAR H273A. En modos de realización particulares, la unión de un anticuerpo al epítipo se demuestra por una reducción en dicha unión por dicho anticuerpo cuando el residuo D (Asp) en la posición 275 o 277 en uPAR humano muta a un residuo A (Ala) (uPAR D275A o uPAR D277A, respectivamente). De manera preferente, la cantidad de unión se demuestra por co-inmunoprecipitación del anticuerpo y uPAR D275A o uPAR D277A, respectivamente. En los modos de realización anteriores, por ejemplo, una reducción de la unión por el anticuerpo se demuestra por una cantidad reducida de uPAR mutado (por ej., uPAR K268E, uPAR K268A, uPAR H273A, uPAR D275A, o uPAR D277A) que se co-inmunoprecipita con el anticuerpo con relación a la cantidad de uPAR natural (por ej., uPAR unido a membrana o suPAR) o un fragmento de suPAR (por ej., D2D3 suPAR) que co-inmunoprecipita con el anticuerpo.

En algunos modos de realización, la unión del anticuerpo a un epítipo de la invención se demuestra mediante un ensayo de intercambio de deuterio, en el que la unión de un anticuerpo (por ej., ATN-658) a un epítipo de una proteína (por ej., suPAR humano) reduce la capacidad de ese epítipo de intercambiar deuterio. En modos de realización particulares, suPAR humano entra en contacto con un anticuerpo, y la unión del anticuerpo a un epítipo de uPAR humano se demuestra por una reducción en el nivel de deuteración en el epítipo en presencia del anticuerpo en condiciones de unión, con relación a la deuteración en el epítipo en ausencia del anticuerpo. A la inversa, una zona de suPAR que no está en contacto con el anticuerpo posee el mismo o similar nivel de deuteración en presencia o ausencia del anticuerpo en condiciones de unión. De manera preferente, el ensayo de deuteración se realiza con un fragmento de uPAR humano que contenga, o consista en los dominios 2 y 3 (D2D3). En modos de realización específicos, la unión del anticuerpo a un epítipo de suPAR humano se demuestra por una reducción del nivel de deuteración en el epítipo de suPAR humano, en presencia del anticuerpo en condiciones de unión, de al menos el 10%, o al menos del 20%, o al menos del 30%, o al menos del 40%, o al menos del 50%, con relación al nivel de deuteración en el epítipo en ausencia del anticuerpo.

De manera preferente, los anticuerpos o los fragmentos de los mismos según la invención se aíslan o purifican. En ciertos modos de realización, el anticuerpo, o el fragmento fijador del antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal (preferentemente un IgG) o un scFv. En ciertos modos de realización, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. En ciertos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo bi-específico. En ciertos modos de realización, el anticuerpo no es ATN-658.

En un modo de realización preferente, los anticuerpos modulan la señalización en sentido descendente del receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa y pueden interferir con uPAR e inhibir su señalización, incluyendo, sin ánimo exhaustivo, (a) el ensamblaje de fibronectina mediado por uPAR, (b) la unión de fibronectina o un fragmento de la misma a integrina  $\alpha 5 \nu 1$  y/o (c) el ensamblaje de componentes de vitronectina. Los anticuerpos

también pueden regular a la baja el número de moléculas uPAR en la membrana celular.

En un modo de realización preferente, los anticuerpos según la invención se conjugan con un agente terapéutico o marcador detectable. Un marcador detectable incluye, sin ánimo exhaustivo, un radionucleido, un agente que se puede registrar en imágenes PET, un agente que se puede registrar en imágenes MRI, un agente fluorescente, un fluorógeno, un cromóforo, un cromógeno, un agente fosforescente, un quimioluminiscente o un bioluminiscente. Los radionucleidos representativos incluyen, sin ánimo exhaustivo:  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{169}\text{Yb}$  and  $^{201}\text{Tl}$ . Los fluorescentes o fluorógenos representativos incluyen, sin ánimo exhaustivo, fluoresceína, rodamina, dansilo, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído, fluorescamina, un derivado de la fluoresceína, Oregon Green, Rhodamine Green, Rhodol Green y Texas Red. Un agente terapéutico incluye, sin ánimo exhaustivo, un medicamento quimio-terapéutico, una toxina o un radionucleido terapéutico.

También se divulga un compuesto farmacéutico que comprende un anticuerpo o fragmento fijador del antígeno del mismo; y un vehículo aceptable a nivel farmacéutico. Los compuestos farmacéuticos pueden utilizarse en métodos para inhibir la migración celular, invasión celular, proliferación celular o angiogénesis o para inducir apoptosis, por contacto con células asociadas a una migración, invasión, proliferación o angiogénesis celular no deseada, con una cantidad efectiva de un compuesto farmacéutico según la invención. Los compuestos farmacéuticos también pueden utilizarse en métodos para tratar a un sujeto con una enfermedad, trastorno o estado caracterizado por una angiogénesis no deseada, crecimiento tumoral y/o metástasis tumoral, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto farmacéutico según la invención.

### Descripción breve de las figuras

Los detalles de la invención se aprecian en las figuras que se acompañan, no pretendiendo éstas ser limitativas del alcance de la invención:

- La Figura 1 presenta la secuencia de aminoácidos de la forma no procesada de uPAR humano (UniProtKB/Swiss-Prot Accession No. Q03405 (SEQ ID NO: 15). La forma procesada (madura) de uPAR humano carece de los primeros 22 aminoácidos (indicado en negrita).
- La Figura 2 muestra datos de un ensayo de unión de ATN-658 y ATN-617. Se incubaron células HeLa con 5nM  $^{125}\text{I}$ -scuPA (uPA monocatenario, ver Holmes et al.; Biotechnology 3:923-929 (1985)) en presencia o ausencia de 300nM de scuPA no marcado o de 300nM ATN-658. ATN-617, un anticuerpo monoclonal anti-uPAR que bloquea la unión de uPA a uPAR aparece compitiendo como control con la unión de scuPA. Los datos muestran que el anticuerpo monoclonal ATN-658 no compete con la unión de uPA a células HeLa. La unión de ATN-658 a células HeLa no inhibió la unión de  $^{125}\text{I}$ -scuPA.
- La Figura 3 muestra el resultado de un ensayo de crecimiento tumoral en un modelo de ratón de cáncer de ovario. Los datos muestran que ATN-658 inhibe el crecimiento tumoral en el modelo de cáncer de ovario A2780 tan efectivamente como el cisplatino. Las células A2780 expresan solamente uPAR y no uPA.
- La Figura 4 muestra el resultado de un ensayo de crecimiento tumoral en un modelo de ratón de cáncer de pulmón. Los datos muestran que ATN-658 inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de pulmón A549 (células no pequeñas) en el que se inocularon  $10^6$  células tumorales. Las células A549 expresan tanto uPA como uPAR.
- La Figura 5A es una tabla que muestra los 9 residuos aminoácidos de uPAR que difieren entre humanos, monos verdes africanos y macacos comedores de cangrejos y de cola larga.
- La Figura 5B muestra los resultados de un ensayo de co-inmunoprecipitación realizado con ATN-658 (o ATN-615 como control) y uPAR de mono, natural o con las mutaciones indicadas. Los datos de inmunoprecipitación muestran que ATN-658 no se une a uPAR de mono, sino que una mutación de uPAR de mono en la posición 268 desde E (Glutamina) a K (Lisina), que corresponde al aminoácido en la posición 268 en uPAR humano, realiza la unión de ATN-658. Mutar los otros residuos aminoácidos de uPAR de mono a los correspondientes residuos aminoácidos de uPAR humano no realizó la unión de ATN-658.
- La Figura 6 es una tabla que presenta los datos de unión de un análisis de la mutagénesis mediante alanina de uPAR humano. Los datos de la tabla muestran que mutaciones de varios residuos de aminoácidos, es decir, residuos aminoácidos 268, 273, 275 y 277, de uPAR humano reducen la unión de ATN-658 al epítipo de uPAR. Se indica la relativa afinidad de unión de ATN-658 al correspondiente uPAR humano (natural o mutado), designando la afinidad elevada de unión como ++++ y las afinidades menores como ++, + y +.
- La Figura 7A muestra un diagrama esquemático que describe las etapas y el principio subyacente al ensayo de Intercambio de Deuterio utilizado para trazar el epítipo de uPAR humano al que se une ATN-658; y las Figuras 7B y 7C muestran los datos de trazado del epítipo de los ensayos de Intercambio de Deuterio con uPAR humano D2D3 en presencia y ausencia de ATN-658. El porcentaje aproximado de reducción (diferencia) en nivel de deuteración se indica para la correspondiente región del epítipo.

### Descripción detallada de la invención

uPAR es un objetivo ideal para anticuerpos porque se expresa en la superficie celular. La expresión de uPAR en el

interfaz tumor-vasculatura (en células tumorales invasivas, células endoteliales angiogénicas o macrófagos asociados a tumores) sugiere que los anticuerpos dirigidos a esta proteína no experimentarán los mismos obstáculos a su difusión que han impedido a otros anticuerpos monoclonales penetrar en tumores y servir de agentes de diagnóstico o ejercer efectos terapéuticos. Y lo que es importante, uPAR no se expresa normalmente en tejidos inactivos, lo cual debería minimizar el potencial de toxicidad cuando se emplea un anticuerpo terapéutico y minimizar señales no específicas (o falsos positivos) al emplear un anticuerpo para diagnóstico.

La presente invención se basa, en parte, en la caracterización de los inventores del epítipo objeto del anticuerpo monoclonal específico del uPAR, ATN-658. El hibridoma que secreta el anticuerpo monoclonal ATN-658 ha sido depositado según las disposiciones del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 1 de febrero de 2017, y asignado ATCC Accession No. PTA-8191. Este anticuerpo no afecta a la unión de uPA a su receptor. Los anticuerpos que se unen a este epítipo presentan vías de señalización en sentido descendente, incluyendo ligandos "en sentido descendente" como integrinas, proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP) y otros agentes de unión. Estas interacciones en sentido descendente se consideran importantes para los procesos de migración, invasión y proliferación celular. Es por lo tanto deseable enfocar terapéuticamente estos procesos o detectar el proceso o los componentes implicados mediante diagnóstico.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a métodos y compuestos que contemplan la prevención y tratamiento del cáncer. Un aspecto particular de la divulgación se refiere a métodos y composiciones que contienen compuestos que inhiben la proliferación e invasión de células cancerígenas.

La divulgación también presenta métodos de diagnóstico utilizando los anticuerpos del uPAR según la invención. Los métodos de diagnóstico también pueden utilizarse para pronosticar o anticipar la progresión del cáncer. En modos de realización particulares, los métodos de diagnóstico presentan métodos de representar en imágenes y localizar metástasis y métodos de diagnóstico y pronóstico utilizando tejidos y fluidos distales al lugar del tumor primario (así como métodos que utilizan tejidos y fluidos del tumor primario). En otros modos de realización, los métodos de diagnóstico presentan métodos de representar imágenes y localizar metástasis y métodos de diagnóstico y pronóstico *in vivo*.

### 1. Epítipo del anticuerpo monoclonal específico del uPAR ATN-658

Los presentes inventores han trazado un epítipo en uPAR que no está implicado en la unión a uPA. Este epítipo ha sido trazado por su interacción con el anticuerpo monoclonal del uPAR ATN-658, descrito en WO 2005/116077. Las secuencias de región variable de ATN-658 se establecen a continuación:

#### **ATN-658: Secuencias de región variable**

La secuencia de aminoácidos de consenso (código de una sola letra) de polipéptidos de región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) y de región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) del anticuerpo monoclonal ATN-658 se muestran debajo. Las regiones que determinan la complementariedad (CDRs) para cada región variable están resaltadas (cursivas, negrita, subrayado)

ATN-658 V<sub>L</sub> Proteína de consenso (SEQ ID NO: 1):

**DV**VMTQTPLT **LS**VTIGQPAS **ISC****KSSQSL****L** **DS****DGKTYL****NW** LLQRPGQSPK  
**RL**IYLV**SK****LD** **SG**V**PDR**F**TGS** **GS**GT**DFT**L**KI** **SR**VE**AED**L**GV** **Y****YCWQ****GTHFP**  
**L****TFGAG****T****KLE** **L**K**R**DA**APT**V **S**I**F**PP**S**SE**QL** **T**SG**G**AS**V**VC**F** L

ATN-658 V<sub>H</sub> Proteína de consenso (SEQ ID NO: 2):

**EV**QL**Q**SG**PE** **LV**K**TG**AS**V**K**I** **S**CK**AS****GYSFT** **S****YYMH****V**K**Q**S **H**G**K**S**L**E**W**I**G****E**  
**IN****PN****Y****NGG****AS****Y** **NQ****KIK****GR****AT****F** **T**V**D**T**S**S**R**T**A****Y** **M**Q**F**N**S**L**T**S**E**D **S**A**V****Y****C**A**R****S****I**  
**Y****G****H****S****V****L****D****Y****W****G** **Q**T**S**V**S**V**S**S**A** **K**T**T**PP**S**V**Y**PL **A**PG**S**AA**Q**T**N**S **M**

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

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

\*CDR-L1: primer CDR de cadena L; CDR-H2: 2º CDR de cadena H, etc.

Este anticuerpo reconoce el complejo uPA-uPAR.

5 Este anticuerpo fue generado contra un epítipo en el fragmento D2D3 uPAR. Se ha demostrado que un epítipo en D2D3 es crítico para la actividad pro-migratoria de uPA (Andolfo A et al. (2002) Thromb Haemost 88: 298-306). Por lo tanto, se espera que los anticuerpos generados contra el fragmento D2D3 donde este epítipo ya está expuesto, tengan actividad anti-migratoria.

**TABLA 2:** secuencias del epítipo de uPAR

Secuencia	Aminoácidos de uPAR humano <sup>1</sup>	SEQ ID N°
CCTKSGCNHPDLDVQYPSG	265-283	9
CCTKSGCNHPDLDVQYPS	265-282	10
CCTKSGCNHPDLDVQYP	265-281	11
CCTKSGCNHPDLDVQY	265-280	12
CCTKSGCNHPDLDVQ	265-279	13
CGSSDMSCEGRHQSL	98-114	14
KSGCNHPDL	268-277	16

<sup>1</sup> La numeración de aminoácidos refleja la forma procesada de uPAR

10 En un modo de realización, el anticuerpo reconoce un epítipo definido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 9, 10, 11, 12, 13, o 16.

15 En un modo de realización alternativo, el anticuerpo reconoce un epítipo dependiente de conformación definido por (i) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 9, 10, 11, 12, 13, o 16; y (ii) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 14 en el contexto de uPAR humano (SEQ ID N°: 15). En este caso, se puede utilizar uPAR soluble largo (suPAR) (residuos 1-283, dominios 1,2, y 3) como inmunógeno. Sin embargo, un experto en la materia reconocerá que se puede utilizar un fragmento más corto de suPAR como inmunógeno siempre que se mantenga la conformación correcta.

20 En algunos aspectos, un epítipo dependiente de conformación comprende o consiste en secuencias contiguas de aminoácidos de un fragmento de uPAR humano desde la posición 98 a 277, 279, 280, 281, 282, o 283. En otro aspecto, un epítipo dependiente de conformación comprende o consiste en un fragmento aislado de uPAR humano (SEQ ID N°: 15), en el que el extremo amino de dicho fragmento se encuentra en uno cualquiera de los números 93-98 y el extremo carboxilo de dicho fragmento se encuentra cualquiera de los aminoácidos 277-283, o un derivado de los mismos que contenga solamente sustituciones conservadoras relativas a la secuencia de dicho fragmento.

25 También se presentan proteínas de fusión que comprenden dicho fragmento y una secuencia de una proteína diferente. En un aspecto preferente, el epítipo dependiente de conformación conserva su conformación original, tal como se demuestra, por ej., por modelado molecular. En otros aspectos, el epítipo dependiente de conformación se define por (i) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, o 16; y (ii) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, donde se coloca una secuencia de péptidos de enlace entre las secuencias de aminoácidos de (i) y (ii), para que se mantenga la conformación original. En un modo de realización específico, la secuencia de péptidos de enlace imita la conformación original de uPAR. En un modo de realización, la secuencia de péptidos de enlace es heteróloga a uPAR humano. En otro modo de realización, la secuencia de péptidos de enlace es la secuencia interviniente de uPAR humano en la que se han hecho sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia pueden ser sustituidos por otro aminoácido de polaridad similar que actúa como un equivalente funcional, produciendo una alteración silenciosa. Las sustituciones de un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse a partir de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos (básicos) con carga positiva incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos (ácidos) con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Se entiende por lo general que dichas sustituciones son sustituciones conservadoras. Las sustituciones conservadoras de uno o más residuos de aminoácidos se introducen de manera preferente en la secuencia de péptidos en lugares donde no perturben la conformación o actividad original.

45 Péptidos más largos que comprenden estos epítopos uPAR también son contemplados por la presente invención. Por ejemplo, los péptidos uPAR pueden comprender hasta 20, 30, 40 aminoácidos. En un modo de realización los péptidos comprenden residuos de aminoácidos contiguos de uPAR. Estos péptidos más largos consistirán por lo general en un fragmento de uPAR humano y comprenderán la secuencia de epítipo de uPAR. En otro modo de realización, el uPAR es uPAR humano.

La secuencia de aminoácidos de la forma no procesada de uPAR humano UniProtKB/Swiss-Prot Accession No. Q03405 (SEQ ID NO: 15) está representada en la Figura 1.

La forma procesada (madura) de uPAR humano elimina los primeros 22 aminoácidos. Los residuos C-terminal 284-313 (numerados a partir del extremo amino de la proteína madura) también son eliminados por el procesamiento post-translacional cuando uPAR se ancla a la membrana plasmática por un extremo GPI (ver Moller et al., Eur. J. Biochem. 208:493-500 (1992); Low M. G., FASEB J. 3:1600-1608 (1989)). La referencia a uPAR (incluyendo suPAR) en esta aplicación hace referencia a uPAR procesado (maduro) (conteniendo aminoácidos 1-283) a menos que se indique explícitamente lo contrario.

En algunos modos de realización, mutar uno o más residuos de aminoácidos de las secuencias de epítomos de la Tabla 2 reduce o anula la afinidad de unión inmuno-específica del anticuerpo, p. ej., ATN-658, al epítomo, p. ej., tal como está contenido en uPAR humano, que puede estar asociado a membrana o suPAR. En un modo de realización particular, una mutación en el residuo aminoácido 268 de uPAR humano o los epítomos de la Tabla 2 reduce o anula la afinidad de unión inmuno-específica del anticuerpo o fragmentos fijadores del antígeno del mismo al epítomo. En un modo de realización específico, la unión de un anticuerpo al epítomo se demuestra por una reducción en dicha unión por dicho anticuerpo cuando el residuo K (Lys) en la posición 268 en uPAR humano muta a un residuo E (Glu) o a un residuo A (Ala) (uPAR K268A). En otro modo de realización, una mutación en el residuo aminoácido 273 de uPAR humano o los epítomos de la Tabla 2 reduce o anula la afinidad de unión inmuno-específica del anticuerpo o fragmentos fijadores del antígeno del mismo al epítomo. En un modo de realización específico, la unión de un anticuerpo al epítomo se demuestra por una reducción en dicha unión por dicho anticuerpo cuando el residuo H (Hys) en la posición 273 en uPAR humano muta a un residuo A (Ala) (uPAR H273A). En otro modo de realización, una mutación en el residuo aminoácido 275 de uPAR humano o los epítomos de la Tabla 2 reduce o anula la afinidad de unión inmuno-específica del anticuerpo o fragmentos fijadores del antígeno del mismo al epítomo. En un modo de realización específico, la unión de un anticuerpo al epítomo se demuestra por una reducción en dicha unión por dicho anticuerpo cuando el residuo D (Asp) en la posición 275 en uPAR humano muta a un residuo A (Ala) (uPAR H275A). En un modo de realización, una mutación en el residuo aminoácido 277 de uPAR humano o los epítomos de la Tabla 2 reduce o anula la afinidad de unión inmuno-específica del anticuerpo o fragmentos fijadores del antígeno del mismo al epítomo. En un modo de realización específico, la unión de un anticuerpo al epítomo se demuestra por una reducción en dicha unión por dicho anticuerpo cuando el residuo D (Asp) en la posición 277 en uPAR humano muta a un residuo A (Ala) (uPAR H277A). En modos de realización específicos, la mutación de uno o más residuos de uPAR humano, por ej., 268, 273, 275, y/o 277, por ej., tal como se describe en la presente invención, o la mutación de cualquiera de los epítomos de la Tabla 2 reduce la afinidad de unión inmuno-específica del anticuerpo o de un fragmento fijador del antígeno del mismo en al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40% o al menos el 50% con relación a la afinidad del anticuerpo con un uPAR humano natural, por ej., uPAR unido a membrana, suPAR) o a un fragmento de suPAR (por ej., D2D3 suPAR).

La afinidad de unión del anticuerpo o fragmento fijador del antígeno del mismo a uPAR humano o a un fragmento (por ej. D2D3 suPAR) que contiene un epítomo del mismo puede determinarse por métodos muy conocidos en el estado de la técnica, por ej., sin ánimo exhaustivo, por ensayos de co-inmunoprecipitación, ensayo BIAcore, ensayo de intercambio de deuterio y ELISA. En un modo de realización particular, la unión de un anticuerpo al epítomo se demuestra por una reducción de al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% o 70% en dicha unión por dicho anticuerpo cuando el residuo K (Lys) en la posición 268 en uPAR humano muta a un residuo E (Glu) (uPAR K268E) o a un residuo A (Ala) (uPAR K268A). De manera preferente, la cantidad de unión se demuestra por co-inmunoprecipitación del anticuerpo y uPAR K268E o uPAR K268A, respectivamente. En ciertos modos de realización, la unión de un anticuerpo al epítomo se demuestra por una reducción de al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en dicha unión por dicho anticuerpo cuando el residuo H (His) en la posición 273 en uPAR humano muta a un residuo A (Ala) (uPAR K273A). De manera preferente, la cantidad de unión se demuestra por co-inmunoprecipitación del anticuerpo y uPAR H273A. En otros modos de realización, la unión de un anticuerpo al epítomo se demuestra por una reducción de al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en dicha unión por dicho anticuerpo cuando el residuo D (Asp) en la posición 275 o 277 en uPAR humano muta a un residuo A (Ala) (uPAR K275A o uPAR 0277A, respectivamente). De manera preferente, la cantidad de unión se demuestra por co-inmunoprecipitación del anticuerpo y uPAR 0275A o uPAR 0277A, respectivamente. Por ejemplo, una reducción de la unión por el anticuerpo se demuestra por una cantidad reducida de uPAR mutado (por ej., uPAR K268E, uPAR K268A, uPAR H273A, uPAR 0275A, o uPAR 0277A) que se co-inmunoprecipita con el anticuerpo con relación a la cantidad de uPAR natural (por ej., uPAR unido a membrana, suPAR) o un fragmento de suPAR (por ej., D2D3 suPAR) que co-inmunoprecipita con el anticuerpo.

En otros aspectos de la invención, la unión del anticuerpo a un epítomo de la invención se demuestra mediante un ensayo del intercambio de deuterio, en la que la unión de un anticuerpo (por ej., ATN-658) a un epítomo de una proteína (por ej., suPAR humano) reduce la capacidad de ese epítomo de intercambiar deuterio. En modos de realización particulares, suPAR humano entra en contacto con un anticuerpo, y la unión del anticuerpo a un epítomo de uPAR humano se demuestra por una reducción en el nivel de deuteración en el epítomo en presencia del anticuerpo, en condiciones de unión, con relación a la deuteración en el epítomo en ausencia del anticuerpo. A la inversa, una zona de suPAR que no está en contacto con el anticuerpo posee el mismo o similar nivel de deuteración en presencia o ausencia del anticuerpo en condiciones de unión. De manera preferente, el ensayo de



deuteración se realiza con un fragmento de uPAR humano que contenga, o consista en los dominios 2 y 3 (D2D3) (aminoácidos 88-283). En modos de realización específicos, la unión del anticuerpo a un epítipo de suPAR humano se demuestra por una reducción del nivel de deuteración en el epítipo de suPAR humano, en presencia del anticuerpo en condiciones de unión, de al menos el 10%, o al menos del 20%, o al menos del 30%, o al menos del 40%, o al menos del 50%, con relación al nivel de deuteración en el epítipo en ausencia del anticuerpo. En modos de realización particulares, la reducción del nivel de deuteración de al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, o al menos 75% en el epítipo de suPAR se demuestra en presencia del anticuerpo en condiciones de unión, con relación al nivel de deuteración en el epítipo de suPAR en ausencia del anticuerpo. En un modo de realización particular, el anticuerpo está inmovilizado.

El epítipo uPAR y péptidos que comprenden estas secuencias pueden tener utilidad en el diagnóstico y métodos terapéuticos que aquí se describen.

## 2. Anticuerpos del uPAR

Esta divulgación proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento fijador del antígeno del mismo, que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de uPAR definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13. La divulgación también procura un anticuerpo aislado, o fragmento fijador del antígeno del mismo, que se une inmunoespecíficamente a un epítipo dependiente de conformación definido por (i) CCTKSGCNHPDLVDVQYPSG (SEQ ID NO: 9), CCTKSGCNHPDLVDVQYPS (SEQ ID NO: 10), CCTKSGCNHPDLVDVQYP (SEQ ID NO: 11), CCTKSGCNHPDLVDVQY (SEQ ID NO: 12) o CCTKSGCNHPDLVDVQ (SEQ ID NO: 13); y (ii) CGSSDMSERCERGRHQSL (SEQ ID NO: 14) en el contexto de un uPAR humano (SEQ ID NO: 15). Esta divulgación proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento fijador del antígeno del mismo, que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de uPAR definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16. La divulgación también proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento fijador del antígeno del mismo, se une inmunoespecíficamente a un epítipo dependiente de conformación definido por (i) KSGCNHPDL (SEQ ID NO: 16); y (ii) CGSSDMSERCERGRHQSL (SEQ ID NO: 14) en el contexto de un uPAR humano (SEQ ID NO: 15).

Se cree que estos anticuerpos se unen a un complejo binario uPA-uPAR, pero no sustancialmente a (a) uPA libre o (b) la región de uPAR que reconoce y se une a uPA, de modo que el mAb (anticuerpo monoclonal) no inhibe la unión uPA-uPAR. Tal como se utiliza aquí, "unirse inmunoespecíficamente" significa que el anticuerpo, o un fragmento fijador del antígeno del mismo, se une al antígeno a través de su región de reconocimiento del antígeno de su dominio variable.

### 2.1. Producción de anticuerpos monoclonales utilizando epítipos

Los métodos para producir y buscar anticuerpos específicos utilizando tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975); U.S. Patent No. 4,376,110; *Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, New York, NY (1980); H. Zola et al., in *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, 1982). Un animal, preferentemente un ratón, es primovacunado con un inmunógeno como se ha mencionado para suscitar la respuesta del anticuerpo deseada en el animal primovacunado. En otros modos de realización, se primovacuna a un mamífero no humano con un inmunógeno como se ha mencionado para suscitar la respuesta del anticuerpo deseada en el mamífero no humano primovacunado.

En resumen, se puede inmunizar ratones con un epítipo de uPAR y una vez detectada la respuesta inmune, por ej., se detectan anticuerpos específicos del uPAR en el suero del ratón, se estirpa el bazo del ratón y se aíslan esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan mediante técnicas muy conocidas a células de mieloma adecuadas, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponible a partir de ATCC. Se seleccionan hibridomas y se clonan por dilución limitada. Se valoran los clones de hibridoma mediante métodos conocidos en el estado de la técnica en busca de células que secreten anticuerpos capaces de unir uPAR. Se puede generar líquido ascítico, que por lo general contiene altos niveles de anticuerpos, inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

Las secuencias de epítipos de la Tabla 2 se utilizan como un inmunógeno para la generación de los anticuerpos de la descripción. En un modo de realización, se utiliza un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos CCTKSGCNHPDLVDVQYPSG (SEQ ID NO: 9), CCTKSGCNHPDLVDVQYPS (SEQ ID NO: 10), CCTKSGCNHPDLVDVQYP (SEQ ID NO: 11), CCTKSGCNHPDLVDVQY (SEQ ID NO: 12), o CCTKSGCNHPDLVDVQ (SEQ ID NO: 13). En otro modo de realización, se utiliza un fragmento de uPAR humano, de hasta 20, 30 o 40 aminoácidos, comprendiendo la secuencia de aminoácidos CCTKSGCNHPDLVDVQYPSG (SEQ ID NO: 9), CCTKSGCNHPDLVDVQYPS (SEQ ID NO: 10), CCTKSGCNHPDLVDVQYP (SEQ ID NO: 11), CCTKSGCNHPDLVDVQY (SEQ ID NO: 12), o CCTKSGCNHPDLVDVQ (SEQ ID NO: 13). En otro modo de realización se utiliza un péptido que comprende un epítipo dependiente de conformación definido por (i) CCTKSGCNHPDLVDVQYPSG (SEQ ID NO: 9), CCTKSGCNHPDLVDVQYPS (SEQ ID NO: 10),

CCTKSGCNHPDLVDVQYP (SEQ ID NO: 11), CCTKSGCNHPDLVDVQY (SEQ ID NO: 12) o CCTKSGCNHPDLVDVQ (SEQ ID NO: 13); y (ii) CGSSDMSKERGRHQSL (SEQ ID NO: 14) en el contexto de un uPAR humano (SEQ ID NO: 15). También se divulga el uso de un péptido que comprende o, alternativamente, consiste en un epítipo dependiente de conformación definido por (i) (i) KSGCNHPDL (SEQ ID NO: 16); and (ii) CGSSDMSKERGRHQSL (SEQ ID NO: 14) de uPAR humano (SEQ ID NO: 15).

En algunos aspectos, dicho epítipo dependiente de conformación comprende o consiste en secuencias contiguas de aminoácidos de un fragmento de uPAR humano desde la posición 98 a 279, 280, 281, 282, o 283. En un aspecto preferente, el epítipo dependiente de conformación conserva su conformación original, tal como se demuestra, por ej., por modelado molecular. En otros aspectos, el epítipo dependiente de conformación se define por (i) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, o 16; y (ii) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, donde se coloca una secuencia de péptidos de enlace entre las secuencias de aminoácidos de (i) y (ii), para que se mantenga la conformación original. En un modo de realización específico, la secuencia de péptidos de enlace imita la conformación original de uPAR. En un modo de realización, la secuencia de péptidos de enlace es heteróloga a uPAR humano. En otro modo de realización, la secuencia de péptidos de enlace es la secuencia interviniente de uPAR humano en la que se han hecho sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras de uno o más residuos de aminoácidos se introducen de manera preferente en la secuencia de péptidos en lugares donde no perturben la conformación o actividad original. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia pueden ser sustituidos por otro aminoácido de polaridad similar que actúa como un equivalente funcional, produciendo una alteración silenciosa. Las sustituciones de un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse a partir de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos (básicos) con carga positiva incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos (ácidos) con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Se entiende por lo general que dichas sustituciones son sustituciones conservadoras.

En otros modos de realización, un péptido o fragmento de uPAR humano que comprende o consiste en los dominios 2 y 3 (D2D3) correspondiente a los residuos 88-283 de uPAR soluble (suPAR) se utiliza como inmunógeno. Los péptidos que comprendan estas secuencias pueden producirse por una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica, por ej., expresión de genes clonados utilizando métodos recombinantes convencionales, aislamiento de células de origen, poblaciones de células que expresen altos niveles de, por ej., uPA o uPAR, etc. En caso de fragmentos más cortos, pueden ser sintetizados químicamente.

Linfocitos B de nódulos linfáticos, bazo o sangre periférica de un animal primovacunado se fusionan con células de mieloma, generalmente en presencia de un agente favorecedor de la fusión como el polietilenglicol (PEG). Cualquiera de una serie de líneas de células de mieloma de murino están disponibles para dicho uso: líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-k0Ag8.653, Sp2/0-Ag14, o HL1-653 (disponibles en ATCC, Rockville, MD). Las etapas subsiguientes incluyen el cultivo en medio selectivo para que al final las células de mieloma parentales desactivadas y los linfocitos del donante mueran mientras que sólo sobrevivan las células del hibridoma. Éstas se clonan y cultivan y sus sobrenadantes se examinan para detectar la presencia de anticuerpos de la especificidad deseada, por ej., por técnicas de inmunoensayo. Los clones positivos se clonan, por ej., por dilución limitada, y se aíslan los anticuerpos monoclonales.

Los hibridomas producidos según estos métodos se pueden propagar in vitro o in vivo (en líquido ascítico) utilizando técnicas conocidas en el estado de la técnica (ver en general Fink et al., Prog. Clin. Pathol. 9:121-33 (1984)). En general, la línea de células individual se propaga en cultivo y el medio de cultivo que contiene altas concentraciones de un único anticuerpo monoclonal puede ser recogido por decantación, filtrado o centrifugado.

Un método preferente para producir un mAb de acuerdo con la presente invención es el siguiente.

Un epítipo de la tabla 2 se conjuga preferentemente con una proteína portadora, por ej., KLH, y se inyecta en ratones BALB/c intraperitonealmente (i.p.) en adyuvante completo de Freund (por ej., conjugado 50 µg), seguido de dos inyecciones adicionales de la misma dosis en adyuvante incompleto de Freund en intervalos de dos semanas. Después de un mes, se administra una inyección final i.p. (por ej., 50 µg en 0,5 ml PBS) y preferentemente también de manera intravenosa (i.v.) (por ej., 50 µg en 0,2 ml) sin adyuvante.

Se recolectan células del bazo tres días después de la inyección final y se fusionan con P3X63AF8/653 u otras células de mieloma utilizando técnicas estándar.

Después de la inmunización utilizando protocolos estándar, se emplean técnicas convencionales para generar líneas de células de hibridoma de los animales inmunizados y para generar anticuerpos monoclonales que tengan las propiedades deseadas.

### 3. Cribado y caracterización de anticuerpos del uPAR

Para el cribado primario es preferible suPAR puro inmovilizado sobre plástico. Muchas líneas de células tumorales que sobreexpresan uPAR son muy conocidas y disponibles al público; se pueden utilizar para el cribado. Por ejemplo, también pueden utilizarse células como la línea HeLa que sobreexpresan uPAR para demostrar la unión celular de un mAb anti-uPAR. Las células se distribuyen por lo general en microplacas de 96 pocillos. Las células pueden fijarse, por ej., con metanol/acetona (50/50), y detectarse la unión mediante tinción de inmunofluorescencia. De manera alternativa, los mAbs pueden etiquetarse, utilizando isótopos radiactivos u otros trazadores como biotina, y detectarse la unión mediante la medición de radioactividad o biotina.

En un modo de realización, un sobrenadante de hibridomas (por ej., 50 µl) se añade a pocillos que contengan 293 células fijadas durante aproximadamente 1,5 h. a 37°C. Las placas se lavan dos veces en tampón de lavado (como PBS/0.05% Tween-20), y se añade IgG de cabra anti ratón conjugado con rojo de Rodamina (por ej., 30 µl/pocillo) en una dilución adecuada, como 1:100, durante 1,5 h a 37°C. Después del lavado en un tampón de lavado, se examinan las células para detectar la presencia de inmunofluorescencia; en el modo de realización aquí descrito, se utiliza un microscopio de fluorescencia.

En este modo de realización, la inmunofluorescencia es la base para determinar si un sobrenadante de hibridomas contiene un anticuerpo específico para el complejo uPA/uPAR (aunque también puede utilizarse la tinción inmunohistoquímica). Si los sobrenadantes muestran una tinción positiva se seleccionan y expanden los clones de hibridomas y se prueba la reactividad de los sobrenadantes al complejo mediante ELISA.

En un ensayo ELISA preferente, el péptido se acopla a ovalbúmina (OVA) como proteína portadora y el conjugado péptido/OVA se distribuye en pocillos de una placa EIA de 96 pocillos que reciben, por ej., 2 µg/ml de conjugado en 50 µl de tampón de recubrimiento (0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6). Las placas se incuban durante la noche a 4° C, bloqueadas con un tampón de bloqueo adecuado, por ej., PBS que contenga 1% BSA (200 µl/pocillo) durante la noche a 4° C. Los sobrenadantes de hibridomas (por ej., 50 µl) se añaden a los pocillos durante 1,5 horas a temperatura ambiente.

Las placas se lavan dos veces en tampón de lavado (por ej., PBS/ 0,05% Tween-20), y se añade anticuerpo secundario acoplado a enzima, como IgG de cabra anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina (50 µl/pocillo) en una dilución adecuada, por ej., 1:2000. Las placas se incuban durante 1,5 horas a TA. Tras lavar 4X en tampón de lavado, se añade un sustrato cromogénico adecuado para la enzima, por ej., CP-nitrofenilfosfato en este modo de realización (disponible en Kirkegaard and Perry Co., Gaithersburg, MD), durante aproximadamente 30 minutos y se mide la absorbencia a una longitud de onda adecuada al producto coloreado (aquí 405nm). Los sobrenadantes de hibridomas que reaccionan con fuerza con el péptido portador del epítipo (por ej., A<sub>405</sub> >1.0 cuando los controles negativos son <0.02) son reclonados (preferentemente dos veces) y se confirma de nuevo la reactividad de mAb mediante ELISA como anteriormente.

Los anticuerpos anti-uPAR de la divulgación se ponen a prueba preferentemente en modelos de tumores xenogéneos, de los que dos modelos preferentes son los modelos A2780 y A549 (descritos con más detalle más adelante).

Los anticuerpos se evalúan para detectar actividad anti-angiogénica directa en un modelo in vivo de tapón Matrigel. Se utilizan anticuerpos radioyodinados para probar la internalización de los anticuerpos utilizando células MDA MB 231 que expresan tanto el receptor como el ligando. La internalización de anticuerpos también se mide en presencia de PAI-1: complejos uPA.

#### 4. Formas de anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en los métodos de la divulgación incluyen, sin ánimo exhaustivo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos (incluyendo anticuerpos bi-específicos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, Fvs monocatenarios (scFv) (incluyendo scFvs bi-específicos), anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs unidos a disulfuros (sdFv), y fragmentos de unión a epítipos de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos utilizados en los métodos de la presente descripción incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un punto de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a uPAR. Las moléculas de inmunoglobulina de la divulgación pueden ser de cualquier tipo (por ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA and IgY), clase (e.g., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> y IgA<sub>2</sub>) o subclase de moléculas de inmunoglobulina. También se incluyen anticuerpos anti-idiotípicos específicos para el idiotipo de, por ejemplo, un anticuerpo anti-uPA/uPAR.

La divulgación abarca también los derivados de anticuerpos . El término "derivado" tal como se usa aquí hace referencia a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de uPAR, o un fragmento de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de uPAR, que ha sido alterado por la introducción de sustituciones, supresiones o adiciones de residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones). En algunos modos de realización, un derivado de anticuerpo o fragmento del mismo comprende sustituciones, supresiones o adiciones de residuos de aminoácidos en una o más

CDRs. El derivado del anticuerpo puede tener sustancialmente la misma unión, mejor unión o peor unión cuando se compara con un anticuerpo no derivado. En modos de realización específicos, se han sustituido, suprimido o añadido (es decir, mutado) uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos de aminoácidos de la CDR. El término "derivado" tal como se usa aquí también se refiere a un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a uPAR, o un fragmento de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un uPAR que ha sido modificado, es decir, por la fijación covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido. Por ejemplo, pero sin ánimo exhaustivo, un anticuerpo del uPAR, o fragmento de anticuerpo del uPAR puede ser modificado, por ej., por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de bloqueo/protectores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Un derivado de un anticuerpo del uPAR, o fragmento de anticuerpo, puede ser alterado por modificaciones químicas usando técnicas conocidas para los expertos en la materia, incluyendo, sin ánimo exhaustivo, escisión química, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un derivado de un anticuerpo del uPAR o fragmento de anticuerpo, puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos usados en los métodos de la divulgación pueden ser de origen animal incluyendo aves y mamíferos (por ej., humanos, murinos, asnos, ovejas, conejos, cabras, conejillos de indias, camellos, caballos o pollos). En un modo de realización específico, los métodos de la invención pueden ser de un mamífero no humano. De manera preferente, los anticuerpos son humanos o anticuerpos monoclonales humanizados. Como se utiliza aquí, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bancos de inmunoglobulina humana o de ratones u otros animales que expresen anticuerpos de genes humanos.

Los anticuerpos usados en los métodos de la presente divulgación pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de una multiespecificidad mayor. Los anticuerpos multiespecíficos pueden unirse inmunoespecíficamente a diferentes epítomos de uPAR o pueden unirse inmunoespecíficamente a uPAR y a un epítomo heterólogo, como un polipéptido heterólogo o un material de soporte sólido. Ver, por ej., las publicaciones internacionales nros. WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360, y WO 92/05793; Tutt, et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; patentes estadounidenses nros. 4,474,893, 4,714,681, 4,925,648, 5,573,920, y 5,601,819; y Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. En ciertos modos de realización, un anticuerpo biespecífico que se une al epítomo de ATN-658 y otro epítomo uPAR. Ver Gardsvoll et al., 2006, J. Biol. Chem. 281(28):19260-72; Gardsvoll et al., 1999, J. Biol. Chem. 274(53):37995-8003.

Los anticuerpos de la presente divulgación también pueden ser generados utilizando varios métodos de expresión en fago conocidos en el estado de la técnica. En los métodos de expresión en fago, los dominios de anticuerpos funcionales se expresan en la superficie de partículas de fago que transportan las secuencias polinucleótidas que los codifican. En particular, secuencias de ADN que codifican dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> son amplificadas a partir de bibliotecas de ADNc animal (por ej., bibliotecas de ADNc de tejidos linfoides murinos o humanos). El ADN que codifica los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se recombinan juntos con un enlace scFv por PCR y se clonan en un vector fagémida (por ej., p CANTAB 6 o pComb 3 HSS). El vector es electroporado en *E. coli* y el *E. coli* se infecta con fagos ayudantes. Los fagos utilizados en estos métodos son por lo general fagos filamentosos incluyendo fd y M13 y los dominios V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> se fusionan por lo general de manera recombinante al gen III o gen VIII del fago. Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al epítomo uPAR de interés pueden ser seleccionados o identificados con antígeno, por ej., utilizando antígeno marcado o antígeno unido o fijado a una superficie sólida o gota. Ejemplos de métodos de expresión en fago que pueden utilizarse para hacer los anticuerpos de la presente divulgación incluyen los mencionados en Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Métodos 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Métodos 184:177; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene 187:9; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57:191-280; Solicitud Internacional nro. PCT/GB91/01134; Publicaciones Internacionales nros. WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, and WO97/13844; and U.S. Patent Nos. 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743 and 5,969,108.

Tal como se describe en las anteriores referencias, después de la selección del fago, las regiones de codificación de anticuerpos del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado y expresado en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, de insecto, de vegetales, levadura, y bacterias, por ej., tal como se describe más adelante. También pueden emplearse técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> utilizando métodos conocidos en el estado de la técnica como los divulgados en la Publicación Internacional nro. WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, BioTechniques 12:864; Sawai et al., 1995, AJRI 34:26; y Better et al., 1988, Science 240:1041.

Para generar anticuerpos completos, se puede emplear iniciadores PCR incluyendo secuencias de nucleótidos V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub>, un punto de restricción y una secuencia flanqueadora para proteger el punto de restricción para amplificar las secuencias V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> en clones scFv. Utilizando técnicas de clonado conocidas por los expertos en la materia, los dominios V<sub>H</sub> amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresen una región constante V<sub>H</sub>, por ej., la región constante humana gamma 4, y los dominios V<sub>L</sub> amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresen una región VL constante, por ej., regiones constantes humanas kappa o lambda. Los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> también pueden clonarse en un vector que exprese las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión

de cadena pesada y los vectores de conversión de cadena ligera son co-transfectados a continuación a líneas de células para generar líneas de células estables o transitorias que expresen anticuerpos de longitud completa, por ej., IgG, usando técnicas conocidas por los expertos en la materia.

#### 5 4.1. Fragmentos de anticuerpos

Se entiende que el término "anticuerpo" incluye tanto moléculas de inmunoglobulina intacta (Ig) como fragmentos y derivados de ellas, que pueden ser producidas por escisión proteolítica de moléculas Ig o por manipulación genética o química. Los fragmentos incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, cada uno de los cuales es capaz de unirse a antígenos. Los "fragmentos" aquí descritos incluyen un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a polipéptido de uPAR. De manera preferente, los fragmentos de anticuerpos son fragmentos de unión a epítipo.

Un fragmento Fab es una proteína multimérica que consiste en la porción de una molécula Ig que contiene las porciones inmunológicamente activas de una cadena de Ig pesada (H) y una cadena Ig ligera (L) acopladas de forma covalente y capaces de combinarse específicamente con antígeno. Un fragmento (Fab')<sub>2</sub> es un tetrámero que incluye un fragmento de dos cadenas H y dos cadenas L. El fragmento Fv es una proteína multimérica que consiste en las porciones inmunológicamente activas de una región (VH) variable (V) de cadena Ig H y una región (VL) de cadena Ig L acopladas de forma covalente y capaces de combinarse específicamente con antígenos. Estos fragmentos carecen del fragmento Fc de anticuerpo intacto y tienen la ventaja adicional, si se usan terapéuticamente, de quitarse más rápidamente de la circulación y sufrir menos unión de tejido no específica que los anticuerpos intactos. Estos diversos fragmentos se producen utilizando técnicas convencionales como escisión por proteasa o escisión química (ver, por ej., Rousseaux et al., Meth.Enzymol., 121:663-69(1986)). Por ejemplo, el tratamiento con papaína de Ig produce fragmentos Fab; el tratamiento con pepsina produce fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos pueden producirse también por manipulación genética o de proteínas usando métodos bien conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, un fragmento Fab también puede prepararse expresando en una célula huésped adecuada las porciones deseadas de la cadena H y cadena L Ig usando métodos bien conocidos en el estado de la técnica. Los fragmentos Fv se preparan normalmente expresando en una célula huésped adecuada las porciones deseadas de región VH y región VL Ig usando métodos bien conocidos por la técnica.

#### 40 4.2. Anticuerpos monocatenarios

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser producidos como un anticuerpo monocatenario o ScFv en lugar de la estructura normal multimérica. La proteína fijadora del antígeno de cadena sencilla o el anticuerpo monocatenario, también conocido como "scFv", es un polipéptido compuesto de una secuencia de aminoácidos Ig V<sub>L</sub> unido a una secuencia de aminoácidos Ig V<sub>H</sub> por un péptido que une el extremo C de la secuencia V<sub>L</sub> al extremo N de la secuencia V<sub>H</sub>. (Skerra, A. et al. (1988) Science, 240: 1038-1041; Pluckthun, A. et al. (1989) Methods Enzymol. 178: 497-515; Winter, G. et al. (1991) Nature, 349: 293-299); Bird et al., (1988) Science 242: 423; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879; Jost CR et al., J Biol Chem. 1994 269:26267-26273; patentes estadounidenses nros. 4,704,692; 4,853,871; 4,94,6778; 5,260,203; 5,455,030). Secuencias de ADN que codifican regiones V de la cadena H y la cadena L están ligadas a un enlace que codifica al menos 4 aminoácidos (normalmente pequeños aminoácidos neutros). La proteína codificada por esta fusión permite el ensamblaje de una región variable funcional que conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo original. En modos de realización específicos, scFvs incluyen scFvs biespecíficos y scFvs humanizados.

Un método para producir anticuerpos monocatenarios es unir dos o más péptidos o polipéptidos juntos mediante técnicas de química de proteínas. Por ejemplo, los péptidos y polipéptidos pueden sintetizarse químicamente utilizando el equipo de laboratorio actualmente disponible usando o bien Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) o tBoc (tert-butiloxycarbonilo). (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Un experto en la materia puede apreciar inmediatamente que un péptido o un polipéptido correspondiente a una cadena de anticuerpos o fragmento fijador del antígeno de los mismos puede ser sintetizado por reacciones químicas estándar. Por ejemplo, un péptido o polipéptido pueden sintetizarse pero no escindirse de su resina de síntesis mientras que el otro fragmento de anticuerpo puede ser sintetizado y posteriormente escindido de la resina, dejando expuesto por lo tanto un grupo terminal que es funcionalmente bloqueado en el otro fragmento. Por reacciones de condensación de péptidos, estos dos fragmentos pueden unirse covalentemente a través de un enlace peptídico en sus extremos C y N, respectivamente para formar un anticuerpo, o un fragmento del mismo. (Grunt, GA, Synthetic Peptides: A User Guide, W. H. Freeman and Co., N.Y. (1992); Bodansky, M et al., eds, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag Inc., N.Y. (1993)).

Se pueden seleccionar anticuerpos para las propiedades particulares que se deseen. En el caso de un anticuerpo para utilizar *in vivo*, los procedimientos de cribado de anticuerpo pueden incluir cualquiera de los bioensayos *in vitro* o *in vivo* que miden la fijación a por ej., un complejo uPA/uPAR o uPAR-integrina, a células que expresan el polipéptido o epítipo del péptido relevantes.

#### 4.3. Anticuerpos humanos, humanizado y quiméricos

Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos humanos o quiméricos. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo son derivadas de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en el estado de la técnica. Ver, por ej., Morrison 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; y patentes estadounidenses nros. 6,311,415, 5,807,715, 4,816,567, y 4,816,397. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una o más CDRs de una especie y regiones marco de otra especie diferente pueden ser producidos utilizando una variedad de técnicas conocidas en el estado de la técnica incluyendo, por ejemplo, injertos CDR (EP 239,400; Publicación internacional nro. WO 91/09967; y patentes estadounidenses nros. 5,225,539, 5,530,101, y 5,585,089), la remodelación de la superficie (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7:805; and Roguska et al., 1994, PNAS 91:969), y el intercambio de cadenas (patente estadounidense nro. 5,565,332).

Se pueden preparar anticuerpos, fragmentos o derivados que tengan cadenas quiméricas H y cadenas L de la misma o diferente especificidad de fijación de región V mediante la asociación adecuada de las cadenas de polipéptidos individuales, como enseñan, por ejemplo Sears et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 353-357 (1975).

Con este método, se cultivan separadamente huéspedes que expresan cadenas H quiméricas (o sus derivados) a partir de huéspedes que expresan cadenas quiméricas L (o sus derivados), y las cadenas Ig se recuperan separadamente y luego se asocian. De manera alternativa, los huéspedes pueden ser co-cultivados y dejar que las cadenas se asocien espontáneamente en el medio de cultivo, seguido de la recuperación del Ig, fragmento o derivado ensamblados.

Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo quimérico" incluye Igs. monovalentes, divalentes o polivalentes. Un Ab quimérico monovalente es un dímero HL formado por una cadena H quimérica asociada a través de puentes de disulfuro con una cadena L quimérica. Un Ab quimérico divalente es un tetrámero H2L2 formado por dos dímeros HL asociados a través de al menos un puente disulfuro. Un Ab quimérico polivalente también puede ser producido, por ejemplo, empleando una región CH que se una (por ej., de una cadena H IgM, denominada la cadena  $\mu$ ).

La descripción también proporciona "derivados" de los anticuerpos quiméricos, término que incluye aquellas proteínas codificadas por genes truncados o modificados para producir especies moleculares que se parezcan funcionalmente a los fragmentos de Ig. Las modificaciones incluyen, sin ánimo exhaustivo, la adición de secuencias genéticas que codifiquen proteínas citotóxicas como toxinas vegetales y bacterianas. Los fragmentos y derivados pueden ser producidos a partir de cualquiera de los huéspedes descritos.

Un anticuerpo humanizado se refiere a un anticuerpo no humano (por ej., murino) que es un anticuerpo quimérico que contiene una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de región hipervariable del receptor son reemplazados por residuos de región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las que una inmunoglobulina no humana (por ej., anticuerpo de donante) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. De manera preferente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Generalmente el anticuerpo contendrá tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de la cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado puede ser seleccionado a partir de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. Generalmente el dominio constante es un dominio constante fijador del complemento del que conviene que el anticuerpo humanizado muestre actividad citotóxica y la clase es normalmente IgG<sub>1</sub>. Cuando dicha actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante puede ser de la clase IgG<sub>2</sub>. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y seleccionar dominios particulares constantes para optimizar las funciones deseadas del efector entra dentro de las competencias normales de la técnica. El marco y regiones CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder precisamente a las secuencias parentales, por ej., el marco de consenso o CDR del donante pueden ser mutagenizados por sustitución, inserción o supresión de al menos un residuo para que el residuo del

marco o CDR en ese punto no corresponda ni al anticuerpo de consenso o importación. Dichas mutaciones, sin embargo, no serán extensivas. Por lo general, al menos el 75% de residuos de anticuerpo humanizado corresponderá a los de la región del marco parental (FR) y secuencias CDR, más a menudo el 90%, y más preferiblemente más del 95%. Se puede producir anticuerpos humanizados usando una variedad de técnicas conocidas por la técnica, incluyendo sin ánimo exhaustivo, los injertos CDR (patente europea nro. EP 239,400; publicación internacional nro. WO 91/09967; y patentes estadounidenses nros. 5,225,539, 5,530,101 y 5,585,089), la remodelación de la superficie (patentes europeas nros. EP 592,106 y EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; y Roguska et al., 1994, *PNAS* 91:969-973), el intercambio de cadenas (patente estadounidense nro. 5,565,332), y técnicas descritas en, p. ej., las patentes estadounidenses nros. 6,407,213, 5,766,886, 5,585,089, la publicación internacional nro. WO 9317105, Tan et al., 2002, *J. Immunol.* 169:1119-25, Caldas et al., 2000, *Protein Eng.* 13:353-60, Morea et al., 2000, *Methods* 20:267-79, Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84, Roguska et al., 1996, *Protein Eng.* 9:895-904, Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s, Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22, Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10, Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-73, Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525, Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323, y Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596. Los anticuerpos humanos pueden realizarse mediante una variedad de métodos conocidos por la técnica incluyendo métodos de expresión in fago descritos anteriormente utilizando bancos de anticuerpos derivados de secuencias de inmunoglobulina humana. Ver también patentes estadounidenses nros. 4,444,887 and 4,716,111; y publicaciones internacionales nros. WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741. A menudo, los residuos marco de las regiones marco serán sustituidos por el correspondiente residuo del anticuerpo donante de CDR para alterar, y preferentemente mejorar, la fijación del antígeno. Estas sustituciones marco se identifican mediante métodos bien conocidos de la técnica, por ej., por el modelado de las interacciones de los residuos marco y CDR para identificar residuos marco importantes para la fijación del antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos marco inusuales en posiciones particulares. (Ver, p. ej., Queen et al., patente estadounidense nro. 5,585,089; y Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323.)

En un modo de realización, un anticuerpo humanizado de la descripción se fija inmunespecíficamente a uPAR y comprende una, dos o tres CDRs  $V_L$  de un anticuerpo de uPAR en regiones marco humanas. En otro modo de realización, un anticuerpo humanizado de la descripción se fija inmunespecíficamente a uPAR y comprende una, dos o tres CDRs  $V_H$  en regiones marco humanas. En un modo de realización preferente, un anticuerpo humanizado de la descripción se fija inmunespecíficamente a uPAR y comprende una, dos o tres CDRs  $V_L$  y además comprende una, dos o tres CDRs  $V_H$  en regiones marco humanas. En un modo de realización preferente, un anticuerpo humanizado de la descripción se fija inmunespecíficamente a uPAR y comprende tres CDRs  $V_L$  y tres CDRs  $V_H$  en regiones marco humanas. A menudo, los residuos marco de las regiones marco serán sustituidos por el correspondiente residuo del anticuerpo donante de CDR para alterar, y preferentemente mejorar, la fijación del antígeno. Estas sustituciones marco se identifican mediante métodos bien conocidos de la técnica, por ej., por el modelado de las interacciones de los residuos marco y CDR para identificar residuos marco importantes para la fijación del antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos marco inusuales en posiciones particulares. (Ver, por ej., patente estadounidense nro. 5,585,089; y Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323.)

Por lo tanto, en un modo de realización, los anticuerpos quiméricos de la descripción comprenden cadenas Ig H y L quiméricas individuales. La cadena H quimérica comprende una región de fijación del antígeno derivada de la cadena H de un Ab no humano específico para, por ej., un complejo uPA/uPAR o uPAR-integrina que está unido a al menos una porción de una región  $C_H$  humana. Una cadena quimérica L comprende una región de unión al antígeno derivada de la cadena L de un anticuerpo no humano específico para el antígeno de destino unido a al menos una porción de una región  $C_L$  humana. Tal como se utiliza aquí, el término "región de unión al antígeno" se refiere a esa porción de una molécula de anticuerpo que contiene los residuos aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren al anticuerpo su especificidad y afinidad para con el antígeno. La región del anticuerpo incluye los residuos aminoácidos "marco" necesarios para mantener la conformación correcta de los residuos de unión a antígeno (o "de contacto").

Los anticuerpos humanos son anticuerpos que se producen utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada humanos se pueden introducir aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. De manera alternativa, la región variable, región constante y región de diversidad humanas se pueden introducir en las células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena ligera y pesada humanos. Los genes de inmunoglobulina de ratón de cadena ligera y pesada pueden ser hechos no funcionales separada o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humanos por recombinación homóloga. En particular, la supresión de homocigotos de la región  $J_H$  impide la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se utilizan a continuación para producir descendencia homocigota que exprese anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la forma normal con un antígeno seleccionado, por ej., todo o parte de un polipéptido de la invención. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse de ratones transgénicos, inmunizados utilizando tecnología de hibridomas convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humanos albergados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de células B y posteriormente experimentan cambio de clase y

mutación somática. Por lo tanto, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para un resumen de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, ver Lonberg y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Para una descripción detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, ver, por ej., las publicaciones internacionales nros. WO 98/24893, WO 96/34096, y WO 96/33735; y las patentes estadounidenses nros. 5,413,923, 5,625,126, 5,633,425, 5,569,825, 5,661,016, 5,545,806, 5,814,318, y 5,939,598. Además, se puede contactar con empresas como Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y Medarex (Princeton, NJ) para obtener anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando tecnología similar a la descrita anteriormente.

La región de unión a antígeno del anticuerpo quimérico (o un anticuerpo monoclonal humano) de la presente descripción se deriva preferentemente de un anticuerpo no humano específico para, por ej., complejo uPA/uPAR o uPAR/integrina. Fuentes preferentes para la codificación del ADN como un anticuerpo no humano incluyen líneas de células que producen anticuerpos, preferentemente hibridomas, por ej., el hibridoma ATN-658.

De manera alternativa, el anticuerpo no humano productor de células de las que se deriva la región V del Ab de la descripción puede ser un linfocito B obtenido de la sangre, bazo, nódulos linfáticos u otros tejidos de un animal inmunizado con D2D3 de suPAR. La célula productora de Ab que aporta las secuencias de nucleótidos que codifican la región de unión a antígeno del anticuerpo quimérico de la presente descripción también puede ser producida por transformación de una célula no humana, como de un primate, o de una célula humana. Por ejemplo, un linfocito B que produce un anticuerpo específico, por ej., un complejo uPA/uPAR o uPAR-integrina puede ser infectado y transformado con un virus como el virus Epstein-Barr para obtener una célula productora de Ab inmortal (Kozbor et al. *Immunol. Today* 4:72-79 (1983)). De manera alternativa, el linfocito B puede ser transformado proporcionando un gen transformado o producto de gen transformador, como bien se conoce en la técnica. De manera preferente, la región de unión a antígeno será de origen murino. En otros modos de realización, la región de unión a antígeno puede derivarse de otras especies animales, en particular roedores como ratas o hamsters.

El anticuerpo monoclonal quimérico de la presente descripción puede ser producido en grandes cantidades inyectando células de hibridoma o transfectoma secretando el anticuerpo a la cavidad peritoneal de ratones y, tras el tiempo adecuado, recolectando el líquido ascítico que contiene una elevada titulación del anticuerpo monoclonal y aislando el anticuerpo monoclonal del mismo. Para dicha producción in vivo del mAb con un hibridoma no murino (por ej. de rata o humano), las células de hibridoma se cultivan preferentemente en ratones desnudos atímicos o irradiados.

De manera alternativa, los anticuerpos pueden ser producidos cultivando células de hibridoma (o transfectoma) in vitro y aislando el mAb secretado del medio de cultivo celular.

Los genes humanos que codifican las regiones C constantes de los anticuerpos quiméricos de la presente descripción pueden derivarse de un banco de hígado fetal humano o de cualquier célula humana incluyendo aquellos que expresan y producen Igs. humanos. La región humana CH puede derivarse de cualquiera de las clases o isotipos conocidos de cadenas H humanas, incluyendo gamma, mi, alfa, delta o eta, y subtipos de los mismos, como G1, G2, G3 and G4.

Dado que el isotipo de cadena H es responsable de las diversas funciones del efector de un Ab, la elección de región CH estará guiada por las funciones de efector deseadas, como la fijación de complementos, o actividad en citotoxicidad celular dependiente de Ab (ADCC). De manera preferente, la región CH deriva de  $\gamma 1$  (IgG1),  $\gamma 3$  (IgG3),  $\gamma 4$  (IgG4), o  $\mu$  (IgM).

La región CL humana puede derivarse de cualquier isotipo de cadena L humana,  $\kappa$  o  $\lambda$ .

Genes que codifican regiones Ig humanas se obtienen de células humanas por técnicas de clonación estándar (Sambrook J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY(1989)). Los genes de región C humana están fácilmente disponibles a partir de clones conocidos que contienen genes que representan las dos clases de cadenas L, las cinco clases de cadenas H y subclases de los mismos. Fragmentos de Ab quiméricos, como F(ab')<sub>2</sub> y Fab, pueden prepararse diseñando un gen de cadena H quimérico que esté adecuadamente truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifique una porción de cadena H de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> incluiría secuencias de ADN que codifiquen la región bisagra, dominio y CH de la cadena H, seguido por un codón de terminación translacional para producir la molécula truncada.

En general, los anticuerpos quiméricos de la presente descripción se producen clonando segmentos de ADN que codifican regiones de unión a antígeno de cadena H y L de un anticuerpo específico de la descripción, preferentemente no humano, y uniendo estos segmentos de ADN a segmentos de ADN que codifiquen regiones CH y CL humanas, respectivamente, para producir genes que codifican Ig quiméricos.

Por lo tanto, en un modo de realización preferente, un gen fusionado que comprende un primer segmento de ADN que codifica al menos la región de unión a antígeno de origen no humano, como una región V funcionalmente



reorganizada con segmento (J) de unión, fijado a un segundo segmento de ADN que codifica al menos una parte de una región C humana.

5 El ADN que codifica la región de unión a Ab puede ser ADN genómico o ADNc. Una alternativa conveniente al uso de fragmentos de gen cromosomal como fuente de ADN que codifica el segmento de unión a antígeno de región V murino es el uso de ADNc para la construcción de genes Ig quiméricos, tal como menciona Liu et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439 (1987); J. Immuno. 139:3521 (1987).

10 El uso de ADNc requiere que los elementos de expresión del gen adecuados para la célula huésped se combinen con el gen a fin de lograr la síntesis de la proteína deseada. El uso de secuencias de ADNc tiene ventajas sobre las secuencias genómicas (que contienen intrones), porque las secuencias de ADNc pueden expresarse en bacterias y otros huéspedes que carecen de sistemas de empalme de ARN adecuados.

15 Por lo tanto, en un modo de realización que utiliza ADNc que codifica la región V de Ab, el método de producir Ab quimérico implica varios pasos, indicados a continuación:

1. Aislamiento del ARN mensajero (ARNm) de la línea de células que produce el mAb, clonación y producción de ADNc a partir del mismo;
- 20 2. Preparación de una biblioteca de ADNc de longitud completa a partir de ARNm purificado de los que los segmentos de genes de región V adecuados de los genes de cadena L y H pueden ser: (i) identificados con probetas adecuadas, (ii) secuenciados, y (iii) hechos compatibles con un segmento de gen C;
3. Preparación de segmentos de gen de región C por preparación y clonación de ADNc;
4. Construcción de secuencias de codificación de cadena H o L completa por enlace de los segmentos de gen de región V clonados específicos a gen de región C humano clonado, tal como se ha descrito arriba;
- 25 5. Expresión y producción de cadenas L y H quiméricas en huéspedes seleccionados, incluyendo células eucariotas y procariotas.

30 Una característica común de todos los genes de cadena L y H Ig y sus ARNm codificados es la región J. Las regiones J de cadena H y L tienen secuencias diferentes, pero existe un grado elevado de homología de secuencia (mayor del 80%) entre cada grupo, especialmente cerca de la región C. Esta homología es aprovechada en este método y se puede utilizar secuencias de consenso de regiones J de cadena H y L para diseñar oligonucleótidos para su uso como iniciadores para introducir puntos de restricción útiles en la región J para el posterior enlace de segmentos de región V a segmentos de región C humanos.

35 Vectores de ADNc de región C preparados a partir de células humanas pueden ser modificados por mutagénesis dirigida para colocar un punto de restricción en la posición análoga en la secuencia humana. Por ejemplo, se puede clonar la región C de cadena  $\kappa$  ( $C_{\kappa}$ ) y la región C  $\gamma$ -1 humana completa ( $C_{\gamma-1}$ ). En este caso, el método alternativo basado en clones de región C genómica como fuente para vectores de región C no permitirían expresarse a estos genes en sistemas bacterianos donde no haya enzimas necesarias para eliminar las secuencias intervinientes. Los segmentos de región V clonados son eliminados y ligados a vectores de región C de cadena L o H.

40 De manera alternativa, la región C  $\gamma$ -1 humana puede ser modificada introduciendo un codón de terminación generando así una secuencia de genes que codifica la porción de cadena H de una molécula Fab. Las secuencias de codificación con regiones V y C enlazadas son transferidas a continuación a vehículos de expresión adecuados para su expresión en huéspedes apropiados, procariotas y eucariotas.

45 Se dice que dos secuencias de ADN codificadoras están "operativamente enlazadas" si el enlace tiene como resultado una secuencia continuamente traducible sin alteración o interrupción del marco de lectura del triplete. Una secuencia de codificación de ADN está operativamente enlazada a un elemento de expresión génica si el enlace permite la función correcta de ese elemento de expresión génica para tener como resultado la expresión de la secuencia de codificación.

50 Vehículos de expresión incluyen plásmidos y otros vectores. Entre estos vehículos los preferidos son vehículos que transportan una secuencia de cadena CH o CL humana funcionalmente completa con puntos de restricción adecuados manipulados de forma que la secuencia de cadena VH o VL con entremos cohesivos adecuados pueda ser fácilmente insertada en ellos. Los vehículos que contienen una secuencia de cadena CH o CL humana sirven por lo tanto como intermediarios para la expresión de cualquier cadena L o H completa deseada en cualquier huésped adecuado.

55 Un anticuerpo humano-ratón quimérico será normalmente sintetizado a partir de genes producidos por los promotores génicos cromosomiales originarios de las regiones V de cadena H y L del ratón utilizados en los constructos. El empalme se produce por lo general entre el sitio donador de empalme en la región J del ratón y el sitio aceptor de empalme que precede a la región C humana y también en las regiones de empalme que se producen en la región CH humana; la terminación de transcripción y poliadenilación se produce en sitios cromosómicos nativos de retorno (downstream) de las regiones de codificación humanas.

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

Los genes de ADNc Ig pueden expresarse como se describe en Liu *et al.*, supra, y Weidle, UH et al., Gene 51:21-29 (1987), utilizando como elementos de expresión el promotor temprano del SV40 y su potenciador, los potenciadores del promotor de cadena H Ig de ratón, empalme de ARNm de región tardía del SV40, secuencia interviniente beta globina de conejo, sitios de poliadenilación de beta globina de conejo e Ig, y elementos de poliadenilación del SV40. Para genes Ig compuestos en parte de ADNc, en parte de ADN genómico (Whittle, N et al., Protein Eng. 1:499-505 (1987)), el promotor transcripcional es citomegalovirus humano, los potenciadores del promotor son citomegalovirus e Ig ratón/humano y las regiones de poliadenilación y empalme de ARNm provienen de secuencias Ig cromosómicas nativas. En un modo de realización, para la expresión de genes de ADNc en células de roedores, el promotor transcripcional es una secuencia LTR viral, los potenciadores del promotor transcripcional son tanto el potenciador de cadena H Ig de ratón como el potenciador LTR viral, la región de empalme contiene un intrón mayor de 31 bp, y las regiones de terminación de transcripción y poliadenilación se derivan de la secuencia cromosómica nativa correspondiente a la cadena Ig que se está sintetizando. En otros modos de realización, secuencias de ADNc que codifican otras proteínas se combinan con los elementos de expresión arriba indicados para lograr la expresión de las proteínas en células de mamífero.

Cada gen fusionado se ensambla en, o inserta en un vector de expresión. Las células receptoras capaces de expresar el producto génico de cadena de Ig quimérico se transfectan por separado con un gen codificador de cadena L o de cadena H quimérico o se co-transfectan con un gen de cadena L o cadena H quimérico. Las células receptoras transfectadas se cultivan en condiciones que permitan la expresión de los genes incorporados y las cadenas Ig expresadas o fragmentos o anticuerpos intactos se recuperan del cultivo. En un modo de realización, los genes fusionados que codifican las cadenas L y H quiméricas o porciones de las mismas, se ensamblan en vectores de expresión separados que son utilizados a continuación para co-transfectar una célula receptora.

Cada vector puede contener dos genes seleccionables, un primer gen seleccionable diseñado para su selección en un sistema bacteriano y un segundo gen seleccionable diseñado para su selección en un sistema eucariota, donde cada vector tiene un par diferente de genes. Esta estrategia tiene como resultado vectores que primero dirigen la producción y permiten la amplificación de los genes fusionados en un sistema bacteriano. Los genes así producidos y amplificados en un huésped bacteriano se utilizan a continuación para co-transfectar una célula eucariota, y permitir la selección de una célula co-transfectada que transporte los genes transfectados deseados. Ejemplos de genes seleccionables para su uso en un sistema bacteriano son el gen que confiere resistencia a la ampicilina y el gen que confiere resistencia al cloranfenicol. Los genes seleccionables preferentes para su uso en transfectantes eucariotas incluyen el gen xantina-guanina-fosforribosil-transferasa (designado como gpt) y el gen fosfotransferasa de Tn5 (designado como neo)

La selección de células que expresan gpt se basa en el hecho de que la enzima codificada por este gen utiliza xantina como sustrato para la síntesis de nucleótidos de purina, mientras que la enzima endógena análoga no puede.

En un medio que contiene (1) ácido micofenólico, que bloquea la conversión de monofosfato de inosina en monofosfato de xantina (XMP), y (2) xantina, sólo pueden sobrevivir las células que expresa el gen gpt. El producto del gen neo bloquea la inhibición de la síntesis de proteína por el antibiótico G418 y otros antibióticos de la clase neomicina.

Los dos procedimientos de selección se pueden utilizar simultánea o secuencialmente para seleccionarlos para la expresión de genes de cadena de Ig introducidos en dos vectores de ADN diferentes en una célula eucariota. No es necesario incluir marcadores seleccionables diferentes para las células eucariotas; se puede co-transfectar un vector de cadena H y L, que contenga cada uno el mismo marcador seleccionable. Tras la selección de las células resistentes apropiadas, la mayoría de los clones contendrán copias integradas de ambos vectores de cadena H y L.

De manera alternativa, los genes fusionados que codifican las cadenas H y L quiméricas pueden ser ensamblados en el mismo vector de expresión.

Para la transfección de los vectores de expresión y la producción del anticuerpo quimérico, la línea celular receptora preferente es una célula de mieloma. Las células de mieloma pueden sintetizar, ensamblar y secretar Igs codificados por genes Ig transfectados y poseen el mecanismo para la glicosilación del Ig. Una célula receptora particularmente preferente es la célula de mieloma que no produce Ig SP2/0 (ATCC No. CRL 8287). Las células SP2/0 producen solamente Ig codificado por los genes transfectados. Las células de mieloma pueden cultivarse en cultivo o en la cavidad peritoneal de un ratón, donde se puede obtener Ig secretado a partir del líquido ascítico. Otras células receptoras adecuadas incluyen células linfoides como linfocitos B de origen humano o no humano, células de

hibridoma de origen humano o no humano o células de heterohibridoma interespecie.

El vector de expresión portador de un constructo de anticuerpo quimérico de la presente descripción puede ser introducido en una célula huésped adecuada por una variedad de medios adecuados, incluyendo medios bioquímicos como transformación, transfección, conjugación, fusión del protoplasto, precipitación del fosfato de calcio, y aplicación con policaciones tales como dietilaminoetil dextrano (DEAE), y medios mecánicos como electroporación, microinyección directa y bombardeo por microproyectiles.

Las secuencias o genes de codificación de Ig quiméricos de la presente descripción también pueden expresarse en células de mamífero no linfoides o en otras células eucariotas, tales como levadura o células procariotas, en particular bacterias. La levadura proporciona ventajas sustanciales sobre las bacterias para la producción de cadenas L y H de Ig. Las levaduras realizan modificaciones de péptidos post-transcripcionales incluyendo glicosilación. Actualmente existen una serie de estrategias de ADN recombinante que utilizan fuertes secuencias promotoras y plásmidos con un alto número de copias que pueden utilizarse para la producción de las proteínas deseadas en la levadura. La levadura reconoce secuencias líderes de productos génicos de mamíferos clonados y secreta péptidos portadores de secuencias líderes (por ej. pre-péptidos). Los sistemas de expresión génica de la levadura pueden ser evaluados de forma rutinaria para detectar los niveles de producción, secreción y estabilidad de proteínas de cadena H y L quiméricas y anticuerpos quiméricos ensamblados. Se puede utilizar cualquiera de una serie de sistemas de expresión génica de la levadura que incorpore elementos terminadores y promotores de los genes expresados activamente que codifican enzimas glicolíticas producidas en grandes cantidades cuando las levaduras se cultivan en un medio rico en glucosa. Genes glicolíticos conocidos pueden proporcionar también señales de control de transcripción muy eficientes. Por ejemplo, se pueden utilizar las señales terminadoras y promotoras del gen de fosfoglicerato quinasa (PGK). Se puede adoptar varios métodos para evaluar los plásmidos de expresión óptima para la expresión de ADNc de Ig clonado en la levadura (ver Glover, D. M., ed., DNA Cloning, IRL Press, 1985).

También se pueden utilizar cepas bacterianas como huéspedes para la producción de moléculas Ab o fragmentos de Ab descritos aquí. Y también se pueden utilizar cepas K12 de E. coli como E. coli W3110 (ATCC No 27325), y otras enterobacterias como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcescens*, y diversas especies de *Pseudomonas*.

Vectores de plásmidos que contienen secuencias de control y replicón que se derivan de especies compatibles con una célula huésped se utilizan en conexión con estos huéspedes bacterianos. El vector es portador de un sitio de replicación, así como de genes específicos que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Se puede utilizar una serie de métodos para evaluar los plásmidos de expresión para la producción de anticuerpos quiméricos o cadenas de anticuerpos codificadas por los ADNc de Ig clonados en bacterias (ver Glover, *supra*).

Los huéspedes preferentes son células de mamífero, cultivadas in vitro o in vivo. Las células de mamífero proporcionan modificaciones post-transcripcionales a moléculas de proteínas Ig incluyendo supresión de péptidos líder, ensamblado y doblado de cadenas H y L, glicosilación de moléculas de Ab, y secreción de la proteína Ab funcional.

Células de mamífero que pueden ser útiles como huéspedes para la producción de proteínas de Ab, además de las células de origen linfóide descritas anteriormente, pueden ser células de origen de fibroblastos, como Vero (ATCC CRL 81) o CHO-K (ATCC CRL 61). Hay muchos sistemas de vectores disponibles para la expresión de genes de cadena H y L clonados en células de mamífero (ver Glover, *supra*). Se pueden aplicar diferentes métodos para obtener Abs H2L2 completos.

Para uso in vivo, particularmente para la inyección en humanos, es aconsejable reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos monoclonales haciendo anticuerpos quiméricos ratón-humano (o roedor-humano) como se ha mencionado, o humanizando los anticuerpos utilizando métodos conocidos de la técnica. El anticuerpo humanizado puede ser el producto de un animal que tenga genes de región constante de Ig humanos transgénicos (ver por ejemplo WO90/10077 y WO90/04036). De manera alternativa, el anticuerpo objeto de interés puede ser genéticamente manipulado para sustituir los dominios bisagra, CH1, CH2, CH3 y/o el dominio marco con la correspondiente secuencia humana (ver WO 92/02190).

## 5. Conjugados de anticuerpos

La presente descripción comprende el empleo de anticuerpos o fragmentos de los mismos fusionados de manera recombinante o conjugados químicamente (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) con un polipéptido heterólogo (o porción del mismo, preferentemente a un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. La fusión no requiere ser necesariamente directa, pero puede ocurrir a través de secuencias de enlace. Por ejemplo, se puede utilizar anticuerpos para dirigir polipéptidos heterólogos hacia tipos de células particulares, tanto in vitro como in vivo, fusionando o conjugando los anticuerpos con anticuerpos específicos para receptores de superficie celular particulares. Anticuerpos fusionados o conjugados con

polipéptidos heterólogos también pueden utilizarse en inmunoensayos in vitro y métodos de purificación utilizando métodos conocidos por la técnica. Ver por ej., la publicación internacional WO 93/21232; EP 439,095; Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99; la patente estadounidense 5,474,981; Gillies et al., 1992, PNAS 89:1428-1432; y Fell et al., 1991, J. Immunol. 146:2446-2452.

La presente descripción también incluye composiciones que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados o conjugados con fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, los polipéptidos heterólogos pueden fusionarse o conjugarse a un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab)<sub>2</sub>, o porción del mismo. Los métodos para fusionar o conjugar polipéptidos a porciones de anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Ver, *p. ej.*, las patentes estadounidenses nros. 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, y 5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; las publicaciones internacionales nros. WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, PNAS 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; y Vil et al., 1992, PNAS 89:1133711341.

Se puede generar otras proteínas de fusión mediante técnicas de barajado de genes, barajado de motivos, barajado de exones y/o barajado de codones (denominado colectivamente "barajado de ADN"). El barajado de ADN puede emplearse para alterar las actividades de los anticuerpos de la descripción o fragmentos de los mismos, por ej., anticuerpos o fragmentos de los mismos con mayores afinidades y menores índices de disociación). Ver, en general, las patentes estadounidenses nros. 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; 5,834,252; y 5,837,458, y Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16:76; Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265; y Lorenzo and Blasco, 1998, BioTechniques 24:308. Anticuerpos o fragmentos de ellos, o anticuerpos codificados o fragmentos de ellos, pueden alterarse al ser sometidos a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a error, inserción de nucleótido aleatoria u otros métodos antes de la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se unen inmuno específicamente a uPAR pueden recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden fusionarse a secuencias de marcadores, como un péptido para facilitar la purificación. En modos de realización preferentes, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc. 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz et al., 1989, PNAS 86:821, por ejemplo, la hexahistidina permite una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas de péptidos para purificación incluyen, sin ánimo exhaustivo, la etiqueta "HA" hemaglutinina que corresponde a un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., Cell 37:767) y la etiqueta "flag".

### 5.1. Anticuerpos etiquetados diagnósticamente

En otros modos de realización, anticuerpos de la presente descripción o fragmentos o variantes de los mismos se conjugan con un agente detectable o de diagnóstico. Dichos anticuerpos pueden ser útiles para controlar o diagnosticar el desarrollo o progresión de un cáncer como parte de un procedimiento de ensayo clínico, como determinar la eficacia de una terapia particular.

El término "etiquetado diagnósticamente" significa que el presente anticuerpo lleva adjunta una etiqueta detectable diagnósticamente. Hay muchas etiquetas diferentes y métodos de etiquetar conocidos por los expertos en la materia, descritos a continuación. Clases generales de etiquetas que pueden utilizarse en la presente descripción incluyen isótopos radioactivos, isótopos paramagnéticos, y compuestos que pueden ser representados en imágenes por tomografía por emisión de positrones (PET), compuestos de colores o fluorescentes, etc. Etiquetas detectables adecuadas incluyen las radioactivas, fluorescentes, fluorogénicas, cromogénicas y otras etiquetas químicas. Radioetiquetas útiles (radionucleidos) que se detectan simplemente por contador gamma, contador de centelleo o autorradiografía incluyen <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>135</sup>S and <sup>14</sup>C. <sup>131</sup>I es también un útil isótopo terapéutico (ver más abajo).

Una serie de patentes de EE UU describen métodos y composiciones para acomplejar metales en moléculas más grandes incluyendo la descripción de agentes quelantes útiles. Los metales son preferentemente átomos de metales detectables, incluyendo radionucleidos y son acomplejados con proteínas y otras moléculas. Estos documentos incluyen: Patentes estadounidenses 5,627,286; 5,618,513; 5,567,408; 5,443,816; y 5,561,220.

Etiquetas comunes fluorescentes incluyen fluoresceína, rodamina, dansilo, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina. El fluoróforo, como el grupo dansilo, debe ser excitado por luz de una longitud de onda particular, para ser fluorescente. Ver por ejemplo, Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Sixth Ed., Molecular Probes, Eugene, OR., 1996). La fluoresceína, derivados de ella y moléculas similares a la fluoresceína como Oregon Green™ y sus derivados, Rhodamine Green™ y Rhodol Green™, se acoplan a grupos amina utilizando los grupos reactivos de isotiocianato, succinimidil éster o diclorotriacilil. De manera similar, los fluoróforos también pueden acoplarse a tioles utilizando maleimida, iodoacetamida y grupos reactivos de aziridina. Las rodaminas de longitud de onda larga, que son básicamente derivados de Rhodamine Green™ con sustituyentes en los nitrógenos, se encuentran entre los reactivos de etiqueta fluorescente fotoestables más conocidos. Sus espectros no se ven afectados por cambios en pH entre 4 y 10, una ventaja importante sobre las

fluoresceínas para muchas aplicaciones biológicas. Este grupo incluye las tetrametilrodaminas, X-rodaminas y derivados de Texas Red™. Otros fluoróforos preferentes para derivar el péptido según esta invención son los que son excitados por luz ultravioleta. Ejemplos son el azul cascade, derivados de cumarina, naftalenos (de los que es mímembro el cloruro de dansilo, pirenos y derivados de piridiloxazola. También se incluyen como etiquetas dos materiales orgánicos relacionados que han sido descritos recientemente: nanocristales semiconductores, que comprenden por ejemplo, sulfato de cadmio ((Bruchez, M et al., Science 281:2013-2016 (1998), y puntos cuánticos, {por ej., seleniuro Cd terminado por sulfuro de cinc (Chan, WC et al., Science 281:2016-2018 (1998)).

En otro método, se deja que el grupo amino del anticuerpo reaccione con reactivos que dan productos fluorescentes, por ejemplo, fluorescamina, dialdehídos como o-ftaldialdehído, naftaleno- 2,3-dicarboxilato y antraceno-2,3-dicarboxilato. Derivados de 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD), tanto el cloruro como el fluoruro sin útiles para modificar aminas para obtener productos fluorescentes.

El anticuerpo de la descripción también puede ser etiquetado para detección utilizando metales que emiten fluorescencia como <sup>152</sup>Eu u otros de la serie de lantanidos. Estos metales pueden fijarse al péptido utilizando grupos quelantes de metales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). DTPA, por ejemplo, está disponible como anhídrido, que puede modificar rápidamente los péptidos que contienen NH<sub>2</sub> de esta invención.

Para diagnóstico o terapia in vivo, los radionucleoides pueden estar fijados al anticuerpo ya sea directa o indirectamente utilizando un agente quelante como DOTA y DTPA. Ejemplos de dichos radionucleoides son <sup>99</sup>Tc, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>97</sup>Ru, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>72</sup>As, <sup>89</sup>Zr, <sup>90</sup>Y y <sup>201</sup>Tl. En general, la cantidad de anticuerpo etiquetado necesario para detectabilidad en uso diagnóstico variará dependiendo de consideraciones como la edad, condición, sexo y magnitud de la enfermedad en el paciente, contraindicaciones, si las hubiera, y otras variables y debe ser ajustada por el médico o persona que hace el diagnóstico. La dosificación puede variar de 0.001 mg/kg a 100 mg/kg.

El anticuerpo también puede hacerse detectable acoplándolo a un compuesto fosforescente o quimioluminiscente. La presencia del péptido etiquetado quimioluminiscente se determina a continuación detectando la presencia de luminiscencia que surge durante una reacción química. Ejemplos de quimioluminiscentes especialmente útiles son luminol, isoluminol, éster teromático de acridinio, sal de acridinio y éster oxalato. También puede utilizarse un compuesto bioluminiscente para etiquetar los péptidos. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficiencia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente está determinada por la detección de la presencia de luminiscencia. Importantes compuestos bioluminiscentes a efectos de etiquetado son luciferina, luciferasa y aequorina.

En otros modo de realización, se utiliza la detección colorimétrica, basada en compuestos cromogénicos que tienen o provocan cromóforos con elevados coeficientes de extinción.

La detección in situ del péptido etiquetado puede realizarse retirando una muestra histológica de un sujeto y examinándola al microscopio en las condiciones adecuadas para detectar la etiqueta. Las personas entrenadas percibirán inmediatamente que cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (como procedimientos de tinción) pueden ser modificados para conseguir esa detección in situ.

Para imágenes por radioisótopos in vivo para diagnóstico, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor importante para seleccionar un radionucleoide. El radionucleoide elegido debe tener un tipo de desintegración que sea detectable por un instrumento particular. En general, cualquier método convencional para visualizar imágenes de diagnóstico puede ser utilizado de acuerdo con esta invención. Otro factor para seleccionar un radionucleoide para diagnóstico in vivo es que su semivida sea lo suficientemente larga para que la etiqueta siga siendo detectable en el momento de máxima absorción por el tejido de destino, pero lo suficientemente corta para minimizar la irradiación nociva del huésped. En un modo de realización preferente, un radionucleoide utilizado para representación óptica in vivo no emite partículas sino que produce un gran número de fotones en una gama de 140-200 keV, que pueden ser rápidamente detectados por cámaras gamma convencionales.

La representación óptica *in vivo* puede utilizarse para detectar metástasis ocultas que no son observables por otros métodos. La representación óptica puede ser utilizada, por ejemplo, para visualizar tumores de manera no invasiva.

## 5.2. Anticuerpos etiquetados terapéuticamente

La presente descripción comprende también el uso de anticuerpos o fragmentos de ellos conjugados con un agente terapéutico. En un modo de realización, los anticuerpos monoclonales descritos aquí son "terapéuticamente conjugados" o "terapéuticamente etiquetados" (términos que pretenden ser intercambiables) y se usan para proporcionar un agente terapéutico en el sitio en el que se alojan y se unen, como los sitios de metástasis de tumores o focos de infección/inflamación, restenosis o fibrosis. El término "terapéuticamente conjugado" significa que el anticuerpo monoclonal modificado se conjuga con otro agente terapéutico que es dirigido o bien a la causa subyacente o a un "componente" de la invasión tumoral, angiogénesis, inflamación u otra patología. Un polipéptido

terapéuticamente etiquetado lleva una "etiqueta" terapéutica adecuada también denominada aquí "porción terapéutica". Una porción terapéutica es un átomo, una molécula, un compuesto o cualquier componente químico añadido al péptido que lo vuelve activo para tratar una enfermedad o estado target, fundamentalmente asociado a angiogénesis indeseada. La porción terapéutica puede estar unida directa o indirectamente al anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal etiquetado terapéuticamente se administra como un compuesto farmacéutico que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y está preferentemente en una forma adecuada para su inyección.

Ejemplos de radioisótopos terapéuticos útiles (ordenados por número atómico) incluyen  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  and  $^{217}\text{Bi}$ . Los átomos pueden ser conjugados al péptido directamente, indirectamente como parte de un quelato, o en el caso de yodo, indirectamente como parte de un grupo Bolton-Hunter yodado. El radioyodo puede introducirse o bien antes o después de que este grupo sea acoplado al compuesto peptídico.

Dosis preferentes de los conjugados radionucleidos son una función de la radioactividad específica a suministrar al sitio de destino que varía según el tipo de tumor, situación del tumor y vascularización, cinética y biodistribución del portador del péptido, energía de emisión radioactiva por el nucleido, etc. Los expertos en el campo de la radioterapia pueden ajustar rápidamente la dosis del péptido en conjunción con la dosis del nucleido particular para proporcionar el beneficio terapéutico deseado sin experimentación indebida.

Otro enfoque terapéutico incluido aquí es el uso de terapia por captura de neutrones de boro, en la que se suministra un péptido boronado al sitio de destino deseado, como un tumor, preferentemente un tumor intracraneal (Barth, RF, Cancer Invest. 14: 534-550 (1996); Mishima, Y (ed.), Cancer Neutron Capture Therapy, New York: Plenum Publishing Corp., 1996; Soloway, AH et al., (eds), J. Neuro-Oncol. 33: 1- 188 (1997). El isótopo estable  $^{10}\text{B}$  es irradiado con neutrones térmicos de baja energía ( $<0.025\text{eV}$ ), y la captura nuclear resultante produce núcleos  $^7\text{Li}$  y partículas- $\alpha$  que tienen elevada transferencia de energía lineal y longitudes respectivas de paso óptico de aproximadamente 9 y 5 m. Este método está basado en la acumulación  $^{10}\text{B}$  en el tumor con niveles inferiores en sangre, células endoteliales y tejido normal, (por ej. cerebral). Dicho suministro ha sido realizado utilizando factor de crecimiento epidérmico (Yang. W et al., Cancer Res 57:4333-4339 (1997).

Otros agentes terapéuticos que pueden acoplarse a los anticuerpos monoclonales según el método de la descripción son fármacos, profármacos, enzimas para activar profármacos, agentes fotosensibilizadores, terapéutica del ácido nucleico, vectores antisentido, vectores virales, lectinas y otras toxinas.

Las lectinas son proteínas, comúnmente derivadas de vegetales, que se fijan a carbohidratos. Entre otras actividades, algunas lectinas son tóxicas. Algunas de las sustancias más citotóxicas conocidas son toxinas proteínicas de origen bacteriano y vegetal (Frankel, AE et al., Ann. Rev. Med. 37:125-142 (1986)). Estas moléculas se fijan a la superficie celular e inhiben la síntesis de proteínas celulares. Las toxinas vegetales más comúnmente usadas son la ricina y abrina; las toxinas bacterianas más usadas son la toxina diftérica y la exotoxina A Pseudomonas. En ricina y abrina, las funciones tóxicas y de unión están contenidas en dos subunidades de proteínas separadas, las cadenas A y B. La cadena B de la ricina se une a los carbohidratos de la superficie de la célula y promueve la absorción de la cadena A en la célula. Una vez dentro de la célula, la cadena A de la ricina inhibe la síntesis de proteínas desactivando la subunidad 60S del ribosoma eucariota Endo, Y. et al., Biol. Chem. 262: 5908-5912 (1987)). Otras toxinas de origen vegetal, que son proteínas inhibidoras ribosómicas monocatenarias, incluyen la proteína antiviral de hierba camín, proteína del germen del trigo, gelonina, diantinas, momorcarinas, tricosantina y muchas otras 195:1-8 (1986)). La toxina diftérica y la exotoxina A Pseudomonas son también proteínas de cadena simple y sus funciones de fijación y toxicidad residen en dominios separados de la misma proteína. La exotoxina A Pseudomona tiene la misma actividad catalítica que la toxina diftérica. La ricina se ha utilizado terapéuticamente fijando su cadena- $\alpha$  tóxica a moléculas de destino como Abs para procurar el suministro del efecto tóxico en un sitio específico. Las toxinas bacterianas también se han utilizado como conjugados antitumorales. Como se pretende aquí, una cadena o dominio de péptido tóxico se conjuga a un compuesto de esta descripción y se suministra en un sitio de destino donde se desea la actividad tóxica, como un foco metastásico.

La conjugación de toxinas a proteínas como Abs u otros ligandos es conocida por la técnica (Olsnes, S. et al., Immunol. Today 10:291-295 (1989) ; Vitetta, ES et al., Ann. Rev. Immunol. 3: 197-212 (1985)).

Un anticuerpo o un fragmento del mismo puede conjugarse a una porción terapéutica como una citotoxina, por ej., un agente citostático o citocidal, un agente terapéutico o un ion metálico radioactivo, por ej., emisores alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Ejemplos incluyen paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, metotrexato, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantraceno diona, Mitomicina C, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, epirubicina, y ciclofosfamida y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, sin ánimo limitativo, antimetabolitos (*por ej.*, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (*por ej.*, mecloretamina, tioepa cloramucilo, melfalano, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromo manitol, estreptoizotocina, mitomicina

C, y cisdiclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (*por ej.*, daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (*por ej.*, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramycin (AMC)), y agentes anti-mitóticos (*por ej.*, vincristina y vinblastina).

5 Además, un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse con un agente terapéutico o porción de fármaco que modifique una respuesta biológica dada. Agentes terapéuticos o porciones de fármaco no deben interpretarse como limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina como un abrino, ricino A, exotoxina pseudomonas, toxina del cólera, o toxina diftérica; una proteína como el factor de necrosis tumoral, interferón-alfa, interferón-β, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador plasminógeno del tejido, un agente apoptótico, por ej. TNF-α, TNF-β, AIM I (ver publicación internacional nro. WO 97/33899), AIM II (ver, International Publication No. WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi et al., 1994, J. Immunol., 6:1567), y VEGF (ver publicación internacional nro. WO 99/23105), un agente trombotico o un agente anti-angiogénico, por ej., angiostatina o endostatina; o, un modificador de la respuesta biológica como, por ejemplo, una linfoquina (por ej., interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor estimulante de la colonia de macrófagos de granulocitos ("GM-CSF"), y actor estimulante de la colonia de granulocitos ("G-CSF")), o un factor de crecimiento (*por ej.*, hormona de crecimiento ("GH")).

20 Además, un anticuerpo puede conjugarse a porciones terapéuticas como quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos (ver más arriba para ejemplos de materiales radioactivos). En ciertos modos de realización, el agente quelante macrocíclico es ácido 1, 4, 7, 10 tetraazaciclododecano N, N', N'', N''' tetraacético (DOTA) que puede fijarse al anticuerpo por medio de una molécula de enlace. Dichas moléculas de enlace se conocen normalmente en la técnica y están descritas en Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; and Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50.

25 Las técnicas para conjugar porciones terapéuticas con anticuerpos son bien conocidas. Las porciones pueden conjugarse con anticuerpos por cualquier método conocido de la técnica, incluyendo, sin ánimo exhaustivo, enlace Schiff/aldehído, enlace sulfidrido, enlace ácido-lábil, enlace cis-aconitilo, enlace hidrazona, enlace enzimáticamente degradable (ver en general Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216). Otras técnicas para conjugar porciones terapéuticas con anticuerpos son bien conocidas, ver, por ej., Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," en Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58. Los métodos para fusionar o conjugar polipéptidos con porciones de polipéptidos son bien conocidos en el estado de la técnica. Ver, p. ej., las patentes estadounidenses nros. 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, y 5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; las publicaciones internacionales nros. WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, PNAS 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; y Vil et al., 1992, PNAS 89:1133711341. La fusión de un anticuerpo a una porción no requiere ser necesariamente directa, pero puede ocurrir a través de secuencias de enlace. Dichas moléculas de enlace se conocen normalmente en el estado de la técnica y están descritas en Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50; Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216.

De manera alternativa, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como lo describe Segal en la patente estadounidense nro. 4,676,980.

50 Los anticuerpos también pueden fijarse a soportes sólidos, que son especialmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno de destino. Dichos soportes sólidos incluyen, sin ánimo exhaustivo, vidrio, celulosa, poli(acrilamida), nilón, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

## 6. Compuestos farmacéuticos y terapéuticos y su administración

55 Los compuestos que pueden ser empleados en los compuestos farmacéuticos de la descripción incluyen todas las moléculas de polipéptidos, preferentemente, anticuerpos monoclonales, descritos anteriormente, así como las sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos. En un modo de realización específico, el término "farmacéuticamente aceptable" significa autorizado por un organismo reglamentario de un gobierno federal o estatal o que aparezca en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea reconocida para su uso en animales, más especialmente en humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, por ej., adyuvante de Freund (completo e incompleto) o más preferentemente, el adyuvante MF59C.1 disponible en Chiron, Emeryville, CA), excipiente o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo los derivados del petróleo, animales, vegetales o sintéticos, como aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferente cuando el compuesto farmacéutico se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y soluciones de glicerol

y dextrosa acuosa también pueden emplearse como vehículos líquidos, en particular en las soluciones inyectables. Otros excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, cal, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerilo, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerilo, propileno, glicol, agua, etanol y similares. El compuesto, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes emulsionantes o humectantes, o agentes tamponadores de pH. Estos compuestos pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, pastillas, píldoras, cápsulas, polvo, fórmulas de liberación sostenida, etc.

Los compuestos de la descripción pueden formularse como formas neutras o sales.

Las sales de los compuestos de la invención con una adición ácida farmacéuticamente aceptable que contengan un grupo básico se forman cuando sea pertinente con ácidos fuertes o moderadamente fuertes, no tóxicos, orgánicos o inorgánicos mediante métodos conocidos por la técnica. Ejemplos de sales con adición de ácidos que se incluyen en esta invención son sales de maleato, fumarato, lactato, oxalato, metanesulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, tartarato, citrato, hidrocloreto, hidrobromuro, sulfato, fosfato y nitrato.

Sales de compuestos de la invención con adición de bases farmacéuticamente aceptables que contienen un grupo ácido se preparan mediante métodos conocidos a partir de bases orgánicas e inorgánicas e incluyen, por ejemplo, bases de suelos alcalinos y alcalino-metálicos no tóxicos, como hidróxido de amonio y potasio, sodio, calcio; y bases orgánicas no tóxicas como trietilamina, butilamina, piperazina y tri(hidroximetil)metilamina.

En general, los ingredientes de compuestos de la descripción se suministran o bien por separado o mezclados en forma de dosis unitarias, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente sellado como una ampolla o bolsita indicando la cantidad de agente activo. Cuando se debe administrar un compuesto por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estéril. Cuando el compuesto se administra por inyección, se puede suministrar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes puedan mezclarse antes de su administración.

Los compuestos de la descripción, así como las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden incorporarse en formas de dosis convenientes, como cápsulas, obleas impregnadas, pastillas o preparados inyectables. Se puede emplear vehículos sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables.

Vehículos sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio dihidrato, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio y ácido esteárico. Los vehículos líquidos incluyen sirope, aceite de cacahuete, solución salina, agua, dextrosa, glicerilo, etc. De manera similar, el vehículo o diluyente incluye cualquier material de liberación prolongada, como monoesterato de glicerilo o distearato de glicerilo, sólo o con una cera.

Cuando se utiliza un vehículo líquido, el preparado puede tener la forma de jarabe, elixir, emulsión, cápsula de gelatina blanda, líquido inyectable estéril, (por ej., una solución), como una ampolla, o una suspensión líquida acuosa o no acuosa. Un resumen de dichos compuestos farmacéuticos puede encontrarse, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (Gennaro 18th ed. 1990).

Los preparados farmacéuticos se realizan siguiendo técnicas convencionales de química farmacéutica que implican etapas tales como mezclar, granular y comprimir, cuando son para pastillas, o mezclar, rellenar y disolver los ingredientes, según proceda, para obtener los productos deseados para administración oral, parenteral, tópica, transdérmica, intravaginal, intrapeneana, intranasal, intrabronquial, intracraneal, intraocular, intraural y rectal. Los compuestos farmacéuticos también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas como agentes humectantes y emulsionantes, agentes tamponadores del pH, etc.

La presente invención puede ser utilizada en el diagnóstico o tratamiento de cualquiera de una serie de especies y géneros animales y también es aplicable en la práctica de la medicina veterinaria o humana. Por lo tanto, los compuestos farmacéuticos pueden utilizarse para tratar animales comerciales y domésticos, incluyendo aves y de forma más preferente, mamíferos, así como humanos.

El término "administración sistémica" se refiere a la administración de un compuesto o agente como el polipéptido, que aquí se describe, de una manera que tenga como resultado la introducción del compuesto en el sistema circulatorio del sujeto o permite de otro modo su difusión a través del cuerpo, como por ejemplo, por infusión o inyección intravenosa (i.v.). La administración "regional" se refiere a la administración en un espacio anatómico, específico y algo más limitado, como intraperitoneal, intratecal, subdural o en un órgano específico. Los ejemplos incluyen administración intravaginal, intrapeneana, intranasal, intrabronquial(o instilación pulmonar), intracraneal, intra-aural o intraocular. El término "administración local" se refiere a la administración de un compuesto o fármaco en un espacio anatómico limitado o circunscrito, como inyección intratumoral en una masa tumoral, inyecciones subcutáneas (s.c.), intramusculares (i.m.). Alguien experto en la técnica comprenderá que la administración local o regional a menudo tendrá como resultado la entrada de un compuesto en el sistema circulatorio, es decir, de manera que s.c. o i.m. son también rutas para la administración sistémica. Preparados inyectables o infusibles pueden obtenerse de forma convencional, ya sea como soluciones o suspensiones, formas sólidas adecuadas para solución



o suspensión en líquido antes de la inyección o infusión, o como emulsiones. Aunque las rutas preferentes de administración son sistémicas, como i.v., el compuesto farmacéutico puede administrarse por vía tópica o transdérmica, por ej., como un ungüento, crema o gel; por vía oral o rectal, por ej., como un supositorio.

5 Para su aplicación tópica, el compuesto puede incorporarse a vehículos de aplicación tópica como una pomada o ungüento. El vehículo del ingrediente activo puede ser en forma de spray o no. Las formas no spray pueden ser formas sólidas o semi-sólidas que comprenden un vehículo de aplicación tópica y que tenga una viscosidad dinámica preferentemente mayor que la del agua. Fórmulas adecuadas incluyen, sin ánimo exhaustivo, soluciones, 10 suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas, etc. Si se desea, se pueden esterilizar o mezclar con agentes auxiliares, por ej., conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, tampones o sales para influir en la presión osmótica, etc.

Vehículos preferentes para preparados tópicos no en spray incluyen bases de ungüentos, por ej. polietilenglicol-1000 (PEG-1000); cremas convencionales como crema HEB; geles; así como vaselina, etc.

15 También adecuados para su aplicación tópica así como para instilación pulmonar son los preparados en aerosol en los que el compuesto, preferentemente en combinación con un material portador inerte líquido o sólido, se envasa en un frasco comprimible o mezclado con un propulsante normalmente gaseoso, volátil a presión.

20 Los preparados en aerosol pueden contener disolventes, tampones, agentes tensoactivos, perfumes, y/o antioxidantes además de los compuestos de la invención.

Para las aplicaciones tópicas preferentes, especialmente para humanos, es preferible administrar una cantidad efectiva del compuesto en una zona afectada, por ej., la epidermis, membrana mucosa, ojos, etc.

25 Esta cantidad variará por lo general de aproximadamente 0,001 mg a 1 g por aplicación, dependiendo de la zona a tratar, la gravedad de los síntomas y la naturaleza del vehículo tópico empleado.

30 Otros vehículos de aceptación farmacéutica para composiciones de polipéptidos de la presente invención son liposomas, composiciones farmacéuticas en las que la proteína activa está contenida, o bien dispersa o presente de diferentes formas en corpúsculos que consisten en capas concéntricas acuosas adheridas a capas lipídicas. El polipéptido activo está preferentemente presente en la capa acuosa y en la capa lipídica, dentro o fuera, o en cualquier caso, en el sistema no homogéneo generalmente conocido como suspensión liposómica.

35 La capa hidrofóbica, o capa lipídica, en general, pero no exclusivamente, comprende fosfolípidos como la lecitina y esfingomiolina, esteroides como colesterol, sustancias surfactantes más o menos iónicas como dicetil fosfato, estearilamina o ácido fosfatídico, y/o otros materiales de naturaleza hidrofóbica. Los expertos en la técnica apreciarán otros modos de realización adecuados de las presentes formulaciones liposomiales.

40 Composiciones terapéuticas para tratar tumores y cáncer pueden comprender, además del péptido, uno o más agentes anti-tumorales adicionales, como inhibidores mitóticos, por ej., vinblastina; agentes alquilantes, por ej., ciclofosfamida; inhibidores de folatos, por ej., metotrexato, piritrexima o trimetrexato; antimetabolitos, por ej., 5-fluorouracilo y arabinósido de citosina; antibióticos intercalantes, por ej., adriamicina y bleomicina; enzimas o inhibidores de enzimas, por ej., asparaginasa, inhibidores de topoisomerasa como etopósido; o modificadores de la 45 respuesta biológica, por ej. interferones o interleucinas. De hecho, composiciones farmacéuticas que comprendan cualquier agente terapéutico contra el cáncer conocido en combinación con los péptidos aquí descritos entran dentro del alcance de la presente invención. La composición farmacéutica también puede comprender uno o más medicamentos para tratar síntomas adicionales que puedan afectar a los pacientes de destino, como por ejemplo, agentes anti-infecciosos, incluyendo antibacterianos, anti-fúngicos, anti-parásitos, antivirales, y anti-coccidiales.

50 La dosis terapéutica administrada es una cantidad que es terapéuticamente efectiva, como saben o pueden averiguar rápidamente las personas expertas en la técnica. La dosis también dependerá de la edad, salud, peso del receptor, tipo de tratamiento simultáneo, frecuencia del tratamiento y naturaleza del efecto deseado, como, por ejemplo, efectos anti-inflamatorios o efecto anti-bacteriano.

55 Se conocen varios sistemas de suministro que se pueden utilizar para administrar un anticuerpo monoclonal de la descripción o la combinación de un anticuerpo monoclonal de la descripción y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevenir o tratar el cáncer, por ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento del anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (ver, por ej., Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte 60 de un retroviral u otro vector, etc. Métodos de administrar un agente profiláctico o terapéutico de la descripción incluyen, sin ánimo exhaustivo, administración parenteral, por ej., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosal (por ej., vía intranasal, oral e inhalación). En un modo de realización específico, agentes terapéuticos o profilácticos de la descripción se administran por vía intramuscular, intravenosa o 65 subcutánea. Los agentes terapéuticos o profilácticos pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión, por absorción a través de los tejidos epitelial o mucocutáneo (por ej.,

mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

5 En un modo de realización específico, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la descripción localmente en la zona que necesita tratamiento; esto puede realizarse por ejemplo, por infusión local, por inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, como membranas o fibras silásticas.

10 En otro modo de realización, el agente profiláctico o terapéutico puede ser suministrado en un sistema de liberación sostenida o controlada. En un modo de realización, se puede utilizar una bomba para lograr la liberación sostenida o controlada (ver Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otro modo de realización, se pueden emplear materiales poliméricos para obtener la liberación sostenida o controlada de los anticuerpos de la descripción o fragmentos de los mismos (ver, por ej., Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; ver también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105); las patentes estadounidenses nros. 5,679,377; 5,916,597; 5,912,015; 5,989,463; 5,128,326; las publicaciones internacionales nros. WO 99/15154 y WO 99/20253. Ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, sin ánimo exhaustivo, poli-2-hidroxietil-metacrilato), poli(metil-metacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. En un modo de realización preferente, el polímero empleado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas, estable en almacenamiento, estéril y biodegradable.

25 En otro modo de realización, un sistema de liberación sostenida o controlada puede colocarse cerca del objetivo profiláctico o terapéutico, requiriendo por tanto sólo una fracción de la dosis sistémica (ver, por ej. Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

30 Se trata de los sistemas de liberación controlada en el artículo de Langer (1990, Science 249:1527-1533). Cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica puede ser utilizada para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la descripción. Ver, por ej., la patente estadounidense nro. 4,526,938; las publicaciones internacionales nros. WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song et al., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al., 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 26:759-760.

## 7. Métodos terapéuticos

40 Los métodos de esta descripción pueden utilizarse para inhibir la invasión y crecimiento tumoral en un sujeto o para suprimir la angiogénesis inducida por tumores inhibiendo el crecimiento y migración celular endotelial. Al inhibir el crecimiento o invasión de un tumor o angiogénesis, los métodos tienen como resultado la inhibición de la metástasis tumoral. Se administra a un sujeto, preferentemente un mamífero, como un no primate (por ej., vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y a un primate (por ej., mono y humano), más preferentemente un humano, una cantidad del compuesto efectiva para inhibir el crecimiento, invasión o angiogénesis tumoral. El compuesto de sales farmacéuticamente aceptable del mismo se administra preferentemente en forma de una composición farmacéutica como se ha descrito más arriba.

50 La cantidad de la composición de la descripción que será efectiva en la prevención o tratamiento del cáncer puede ser determinada por técnicas de investigación estándar. Se puede extrapolar las dosis efectivas de las curvas de respuesta a las dosis derivadas de sistemas de prueba con modelos animales o in vitro. Por ejemplo, la dosificación de la composición que será efectiva en la prevención o tratamiento del cáncer puede determinarse administrando la composición a un modelo animal, como por ej., los modelos animales descritos aquí o conocidos por los expertos en la técnica. Además, los ensayos in vitro pueden emplearse opcionalmente para identificar gamas de dosificación óptimas.

55 Dosis de las proteínas (incluyendo anticuerpos), péptidos, multímeros de péptidos, etc., incluyen preferentemente unidades de dosificación farmacéutica que comprenden una cantidad efectiva del péptido. La forma de unidad de dosificación se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para un sujeto mamífero; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas de unidades de dosificación está dictada por y directamente dependiente de (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular a lograr, y (b) las limitaciones inherentes de la técnica de realizar dicho compuesto activo para el tratamiento y sensibilidad de sujetos individuales.

65 Por una cantidad efectiva se quiere decir una cantidad suficiente para lograr una concentración de estado constante in vivo que tenga como resultado una reducción mensurable de cualquier parámetro relevante de enfermedad y

puede incluir crecimiento de tumor metastásico o primario, cualquier índice aceptado de reactividad inflamatoria o una prolongación mensurable de intervalo sin enfermedad o de supervivencia. Por ejemplo, se considera eficaz una reducción del crecimiento del tumor en el 20% de pacientes (Frei III, E., The Cancer Journal 3:127-136 (1997)). Sin embargo, un efecto de esa magnitud no se considera que sea un requisito mínimo para que la dosis sea efectiva de acuerdo con esta descripción.

En un modo de realización, una dosis efectiva es preferentemente 10 veces y más preferentemente 100 veces mayor que la dosis efectiva al 50% (ED<sub>50</sub>) del compuesto en un ensayo in vivo tal como se describe aquí.

La selección de la dosis efectiva preferente puede determinarse (por ej., mediante ensayos clínicos) por un experto basada en la consideración de varios factores que serán conocidos por alguien con una competencia normal en la técnica. Dichos factores incluyen el péptido preciso o derivado seleccionado, la enfermedad o estado, la vía de administración, la salud y peso del receptor, la existencia de otro tratamiento paralelo, si lo hubiera, la frecuencia del tratamiento, la naturaleza del efecto deseado, por ejemplo, inhibición de la metástasis del tumor y la opinión del técnico competente.

Una dosis preferente para tratar un sujeto, preferentemente mamífero, más preferentemente humano, con un tumor es una cantidad de hasta 100 miligramos de compuesto activo basado en el polipéptido por kilogramo de peso corporal. Una dosis única típica del péptido o peptidomimético está entre 1 ng y aprox. 100 mg/kg de peso corporal. Para anticuerpos, la dosis administrada a un paciente es normalmente de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. De manera preferente, la dosis administrada a un paciente está entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal del paciente, más preferentemente 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. Para administración tópica, se recomiendan dosis en la gama de 0.01-20% de concentración (por peso) del compuesto, preferentemente 1-5%. Para administración intravenosa es preferible una dosis diaria total en la gama de 0,1 miligramos a 7 gramos. Las gamas anteriores son orientativas, dado que el número de variables en un régimen de tratamiento individual es grande y se esperan desviaciones considerables de estos valores preferentes. En general, los anticuerpos humanos y humanizados tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmune a polipéptidos extraños. Por lo tanto, dosis más bajas de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente suelen ser a menudo posibles.

Una cantidad efectiva o dosis del péptido para inhibir la proliferación celular endotelial o migración in vitro se encuentra en la gama de 1 picogramo a aproximadamente 5 nanogramos por célula. Las dosis efectivas y gamas de dosificación óptima pueden determinarse in vitro utilizando los métodos aquí descritos.

Los compuestos de la invención se caracterizan por producir un efecto inhibitorio sobre la proliferación, migración, invasión celular endotelial o células tumorales, o sobre la angiogénesis o metástasis tumoral o reacciones inflamatorias. Los compuestos son especialmente útiles para producir un efecto anti-tumoral en un huésped mamífero, preferentemente humano, que alberga un tumor en el que la inhibición de la angiogénesis tiene como resultado la reducción de tamaño o índice de crecimiento del tumor o destrucción del tumor. Preferentemente, el sujeto es un humano.

Un ejemplo más largo de enfermedad o estado contra los que es efectivo el método anterior incluye crecimiento primario de un tumor sólido, leucemia o linfoma; invasión tumoral, metástasis o crecimiento de metástasis tumorales; hiperplasia benigna; aterosclerosis; angiogénesis del miocardio; restenosis vascular post angioplastia con balón; formación de neointima después de trauma vascular; restenosis por injerto vascular; formación colateral coronaria; trombosis venosa profunda; angiogénesis de extremidad isquémica; telangiectasia; granuloma piogénico; trastorno de la córnea; rubeosis; glaucoma neovascular; retinopatía diabética y de otro tipo; fibroplasia retrolental; neovascularización diabética; degeneración macular; endometriosis; artritis; fibrosis asociada a un estado inflamatorio crónico, lesión de la médula espinal incluyendo isquemia y fibrosis; fibrosis pulmonar, fibrosis inducida por la quimioterapia; curación de heridas con cicatrices y fibrosis; úlceras pépticas; fractura ósea; queloides; o un trastorno de vasculogénesis, hematopoesis, ovulación, menstruación, embarazo o placentación asociados a una invasión celular patógena o con angiogénesis.

Una enfermedad o estado preferente a ser tratado con el método anterior es el crecimiento, invasión o metástasis tumoral. Esto incluye los tumores cerebrales. Ejemplos de dichos tumores cerebrales son astrocitoma, astrocitoma anaplástico, glioblastoma, glioblastoma multiforme, astrocitoma pilocítico, xantastrocitoma pleiomórfico, astrocitoma subependimial de células gigantes, astrocitoma fibrilar, astrocitoma gemistocítico, astrocitoma protoplástico, oligodendroglioma, oligodendroglioma anaplástico, ependimoma, ependimoma anaplástico, ependimoma mixopapilar, subependimoma, oligastrocitoma mixtos y oligastrocitoma maligno.

El método también se utiliza para tratar una enfermedad uterina como la endometriosis y neovascularización ocular patógena como la asociada con, o a causa de, retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular neovascular relacionada con la edad, retinopatía de prematuridad, retinopatía de células falciformes u oclusión venosa de la retina.

Los inhibidores de la angiogénesis pueden desempeñar un papel en la prevención de la angiogénesis inflamatoria y

gliosis tras una lesión de la médula espinal traumática, promoviendo el restablecimiento de la conectividad neuronal (Wamil, AW et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 95:13188-13193 (1998)). Por lo tanto, las composiciones de la presente descripción se administran lo antes posible tras una lesión de la médula espinal traumática y durante varios días hasta unas dos semanas después para inhibir la angiogénesis y gliosis que impedirían estéricamente el restablecimiento de la conectividad neuronal. El tratamiento reduce la zona dañada en el sitio de la lesión de la médula espinal y facilita la regeneración de la función neuronal y por lo tanto previene la parálisis. Se espera que los compuestos de la invención también protejan a los axones de degeneración Walleriana, despolarización mediada por aminobutirato inversa (que se produce en las neuronas traumatizadas) y mejoren la recuperación de la conductividad neuronal de células del sistema nervioso central aisladas y tejidos en cultivo.

Para otros agentes terapéuticos del cáncer administrados a un paciente, son conocidas sus dosis típicas. Se describe la administración de dosis menores en regímenes de tratamiento en combinación que las dosis recomendadas para la administración de agentes únicos.

La descripción estipula cualquier método de administrar dosis más bajas de agentes terapéuticos o profilácticos conocidos, agentes que anteriormente se consideraron efectivos para la prevención o tratamiento del cáncer. Preferentemente, se administran dosis más bajas de conocidas terapias anti-cáncer en combinación con dosis más bajas de los anticuerpos monoclonales de la descripción.

Como se utiliza aquí, el término "en combinación" se refiere al uso de más de un agente terapéutico y/o profiláctico. El uso del término "en combinación" no restringe el orden en el que se administran agentes profilácticos y/o terapéuticos a un sujeto con un trastorno celular hiperproliferativo, especialmente cáncer. Se puede administrar un primer agente profiláctico o terapéutico antes de (por ej., 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes), simultáneamente con, o posteriormente a (por ej., 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto que tuvo, tiene o puede tener un desorden celular hiperproliferativo, especialmente cáncer. Los agentes profilácticos o terapéuticos se administran a un sujeto en una secuencia y en un intervalo de tiempo de manera que el agente de la invención puede actuar junto con el otro agente para proporcionar mayores ventajas que si fueran administrados de otro modo. Cualquier agente profiláctico o terapéutico adicional puede ser administrado en cualquier orden con los otros agentes profilácticos o terapéuticos adicionales.

## 8. Ensayos

### 8.1. Empleo de anticuerpos para detectar complejos uPA o uPAR por inmunoensayo

Los anticuerpos de esta descripción son útiles en inmunoensayos para detectar moléculas que contienen estos epítopos en muestra de tejido o fluido corporal como suero o plasma. Dichos anticuerpos detectarían el antígeno o un fragmento portador de epítipo del mismo. Así, la proteólisis en el medio tumoral tiene como resultado la liberación de los fragmentos o en el tejido.

Para este propósito se puede emplear cualquier inmunoensayo convencional conocido, aunque los inmunoensayos de enzimas como ELISA son los preferentes. Los métodos de inmunoensayo también se describen en referencias citadas anteriormente.

Los inmunoensayos competitivos se utilizan normalmente para detectar moléculas en una muestra de prueba que son ligados para el complejo que pueden imitar los anticuerpos monoclonales en su especificidad de unión, afinidad, capacidad, etc. En un modo de realización de un ensayo de unión competitiva, se mide la cantidad de anticuerpo unida al complejo (directa o indirectamente usando anti-Ig etiquetado). La competencia (es decir, menos unión de anticuerpo a complejo) en la presencia de la muestra de prueba es la evidencia de que uno o más componentes de la muestra se unen al complejo). Se espera que la mayoría de compuestos sometidos a ensayo se unan con afinidades moderadas (aproximadamente 1-10  $\mu\text{M}$ ).

En otro modo de realización, un soporte sólido, por ej., una microplaca, se recubre con el mAb de interés. La muestra de prueba se añade e incuba, por ej., durante unos 30 minutos para permitir la unión de moléculas relevantes al anticuerpo. Las placas se lavan y el complejo, en forma detectablemente etiquetada (por ej., biotinilado), se añade como ligando competitivo, y se deja competir con la muestra de prueba por unirse al anticuerpo. Un resultado "positivo" de la muestra de prueba se expresará como menos unión del complejo etiquetado unido a la fase sólida. Este método, en el que la solución del complejo y la solución de la muestra no se añaden simultáneamente evita los confusos efectos de la muestra de prueba que se une directamente al complejo, porque cualquier muestra de prueba presente debe ser primero captada por el mAb inmovilizado. De manera preferente, para asegurar que la unión sea específica, se realizan una serie de diluciones para obtener una curva de dilución. Ésta mostrará si, por ejemplo, hay una relación unión/señal menor del 50% con la mitad de la muestra. A falta de dichos efectos de dilución, se puede concluir que múltiples entidades de unión están participando en el

ensayo. Los resultados son más rigurosos si la unión de moléculas en el sitio de unión del mAb tienen afinidades similares.

### 8.1.1. Ensayos inmunohistoquímicos

Un ensayo preferente para detectar los antígenos en un tejido es por inmunohistoquímica, utilizando cualquiera de los métodos de ensayo convencionales, que abundan en la técnica. Un ensayo preferente es el descrito en los ejemplos siguientes. Para una descripción de dicho métodos, ver, por ejemplo, Dabbs, DJ, Diagnostic Immunohistochemistry, Churchill Livingstone, 2001.

### 8.1.2. Inmunoensayos no histológicos

Los inmunoensayos preferentes son inmunoensayos de enzimas (EIA) como ELISA, que emplea antígenos o Abs inmovilizados en soportes sólidos. Para las presentes composiciones y métodos, el soporte sólido es preferentemente uno de poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nilón, poliacrilamida, difluoruro de polivinilideno, celulosa natural, celulosa modificada, nitrocelulosa, agarosa y perlas magnéticas. En un modo de realización preferente, la superficie de poliestireno o de otras placas multipocillos de plástico sirve de soporte sólido. En otro modo de realización, se utiliza un soporte sólido al que se fija el Ab o el antígeno en el fondo o se coloca libremente en los pocillos de placas multipocillos. También se pueden utilizar placas multipocillos en las que los fondos de los pocillos comprenden material de nitrocelulosa o similar a través del cual el líquido puede fluir bajo presión o vacío.

Inmunoensayos típicos y preferentes incluyen ensayos "directos" en los que el Ab inmovilizado sobre un soporte sólido entra primero en contacto con la muestra sometida a prueba para unir o "extraer" el antígeno de la muestra por formación de un complejo ab-antígeno inmovilizado binario. Después de la incubación adecuada, el soporte sólido se lava para eliminar el residuo de la muestra fluida incluyendo antígeno sin fijar, si lo hubiera, para luego entrar en contacto con la solución que contiene una cantidad desconocida de anticuerpo etiquetado (que funciona como una "molécula marcadora"). Tras una segunda incubación, que permite al anticuerpo etiquetado crear un complejo con el antígeno inmovilizado a través de Ab no etiquetado, el soporte sólido se lava una segunda vez para eliminar el Ab etiquetado que no ha reaccionado y se mide la etiqueta inmovilizada. Este tipo de ensayo sandwich directo puede ser un simple ensayo "sí/no" para determinar está presente el antígeno o puede hacerse cuantitativo comparando la cantidad de anticuerpo etiquetado inmovilizado con la cantidad inmovilizada cuando se utiliza una muestra estándar que contiene una cantidad conocida de antígeno.

También pueden utilizarse los llamados ensayos sandwich llamados "simultáneos" e "inversos". Un ensayo simultáneo implica una única etapa de incubación dado que el anticuerpo inmovilizado y el anticuerpo etiquetado se añaden simultáneamente a la muestra. Tras la incubación adecuada, el soporte sólido se lava para eliminar el residuo de la muestra y el anticuerpo etiquetado no complejo. La presencia o cantidad de anticuerpo etiquetado asociado con el soporte sólido es determinado a continuación como en el ensayo sandwich "directo" convencional anterior.

En un ensayo "inverso", se añade una solución del anticuerpo etiquetado a la muestra tras un periodo de incubación adecuado por adición de anticuerpo no etiquetado inmovilizado. Tras una segunda incubación, el material de fase sólida se lava de manera convencional para liberarlo del residuo de la muestra y del anticuerpo etiquetado que no ha reaccionado. A continuación se realiza la determinación del anticuerpo inmovilizado asociado con el soporte sólido como en los ensayos "simultáneo" y "directo".

## 8.2. Ensayos de unión de anticuerpo a uPAR sobre células completas

El Ab dirigido a uPAR y/o conjugado del mismo se somete a prueba de unión a uPAR, preferentemente midiendo la inhibición de la unión de [<sup>125</sup>I]DFP-uPA a uPAR en un ensayo competitivo de unión a ligando o etiquetando directamente el Ab con [<sup>125</sup>I]. El ensayo puede emplear células completas que expresen uPAR, por ejemplo líneas de células como A2780 o HeLa. Un ensayo preferente se realiza como sigue. Se siembran células (aprox. 5 x 10<sup>4</sup>/pocillo) en un medio (*por ej.*, MEM con sales Earl/10% FBS + antibióticos) en placas de 24 pocillos, y luego se incuban en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% húmeda hasta que las células alcancen una confluencia del 70%. uPA de elevado peso molecular catalíticamente inactivado (DFP-uPA) es radioyodado utilizando Iodogen<sup>®</sup> (Pierce) hasta una actividad específica de aprox. 250.000 cpm/μg. Las placas que contienen células se enfrían en hielo y las células se lavan dos veces (5 minutos cada vez) con PBS frío/0,05% Tween-80. Abs de prueba y/o sus conjugados se diluyen en serie en PBS frío/0,01% BSA/0,01% Tween-80 y se añaden a cada pocillo hasta un volumen final de 0,3 mL 10 minutos antes de la adición de [<sup>125</sup>I]DFP-uPA. Cada pocillos recibe a continuación 9.500 cpm de [<sup>125</sup>I]DFP-uPA a una concentración final de 0,2 nM). Las placas se incuban a continuación a 4°C durante 2 horas, y después de ese tiempo las células se lavan 3 x (5 minutos cada) con PBS frío/ 0,05% Tween-80. Se añade NaOH a cada pocillo en 0,5 mL para lisar las células, y la placa se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente o hasta que todas las células de cada pocillo están lisadas tal como se determina por examen microscópico. Se aspira a continuación el contenido de cada pocillo y se determina el recuento total en cada pocillo utilizando un contador gamma. Cada compuesto se prueba por triplicado y los resultados se expresan como porcentaje de la radioactividad medida en

pocillos que contengan sólo [<sup>125</sup>I]DFP-uPA, lo cual representa la unión máxima (100%).

La inhibición de la unión de [<sup>125</sup>I]DFP-uPA a uPAR está por lo general relacionada con la dosis, de manera que la concentración del compuesto de prueba necesario para producir una inhibición del 50% de unión (el valor IC<sub>50</sub>), que se espera caiga en la parte lineal de la curva, se determina fácilmente. En general, Abs y/o conjugados del mismo tienen valores IC<sub>50</sub> de menos de 10<sup>-5</sup> M. Preferentemente, Abs y/o sus conjugados tienen valores IC<sub>50</sub> de menos de 10<sup>-6</sup> M, más preferentemente, menos de 10<sup>-7</sup> M.

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

Los expertos en la técnica apreciarán que los ensayos in vivo e in vitro útiles para medir la actividad de los Abs u otros ligandos de unión a uPAR de la descripción o de sus conjugados, tal como se describe aquí, pretenden ser ilustrativos y en ningún caso exhaustivos o restrictivos.

#### 8.3.1. Ensayo de migración de EC

En estudios de migración de EC, los pocillos transwell se recubren con colágeno tipo I (50 pg/mL) añadiendo 200 µL de la solución de colágeno por transwell, incubando a continuación durante la noche a 37°C. Los transwell se ensamblan en una placa de 24 pocillos y se añade un quimioatrayente (por ej., FGF-2) a la cámara del fondo en un volumen total de medio de 0,8 mL. ECs, como células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC) que han sido desprendidas del cultivo monocapa utilizando tripsina, se diluyen a una concentración final de aprox. 10<sup>6</sup> células/mL con medio libre de suero y 0,2 mL de esta suspensión celular se añade a la cámara superior de cada transwell. Se puede añadir los inhibidores a someter a prueba a las cámaras superior e inferior y se deja que la migración proceda durante 5 horas en una atmósfera humidificada a 37°C. Los transwells se retiran de la placa tintada utilizando DiffQuik®. Las células que no migraron se retiran de la cámara superior frotando con un bastoncillo de algodón y las membranas se desprenden, se montan sobre platinas, y se cuentan bajo un campo microscópico de alta resolución (400x) para determinar el número de células migradas.

#### 8.3.2. Ensayo biológico de actividad anti-invasiva

La actividad de las células como ECs o células tumorales (*por ej.*, células de carcinoma prostático humano PC-3) de invadir a través de una membrana de base reconstituida (Matrigel®) en un ensayo conocido como un sistema de ensayo de invasión Matrigel® es bien conocida (Kleinman et al., *Biochemistry* 1986, 25: 312-318; Parish et al., 1992, *Int. J. Cancer* 52:378-383). Matrigel® es una membrana de base reconstituida que contiene colágeno de tipo IV, laminina, proteoglicanos de sulfato de heparán como perlecán (que se une a y localiza bFGF), vitronectina así como el factor-β de crecimiento transformante (TGFβ), activador de plasminógeno tipo uroquinasa, activador de plasminógeno de tejidos (tPA) y la serpina conocida como inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) (Chambers et al., *Canc Res.* 1995, 55:1578-1585). Es aceptado en la técnica que los resultados obtenidos en este tipo de ensayos para Abs y/o conjugados de los mismos y otros ligandos que se dirigen a receptores extracelulares o enzimas son predictivos de la eficacia de estos Abs y/o conjugados de los mismos in vivo (Rabbani et al., *Int. J. Cancer* 1995, 63: 840-845).

Dichos ensayos emplean insertos de cultivo de tejidos transwell. Las células invasivas se definen como células que penetran a través de Matrigel® y el aspecto superior de una membrana de policarbonato y se adhieren al fondo de la membrana. Transwells (por ej. de Costar) conteniendo membranas de policarbonato (tamaño poros 8,0 µm) se recubren con Matrigel® (por ej., de Collaborative Research), que ha sido diluido en PBS estéril a una concentración final de 75 pg/mL (por ej., 60 µL de Matrigel diluido por inserto) y se colocan en una placa de 24 pocillos. Las membranas se secan durante la noche en una caja de seguridad biológica, y luego se rehidratan añadiendo 100 µL de medio, por ej., DMEM, complementado con antibióticos durante 1 hora en una mesa vibratoria. El DMEM se retira de cada inserto por aspiración y se añade 0,8 mL de DMEM completo (+10% FBS y antibióticos) a cada pocillo de la placa de 24 pocillos de manera que rodee la parte exterior del transwell ("cámara inferior"). Se añade DMEM fresco con antibióticos (100µL), Glu-plasminógeno humano (5 pg/mL), y cualquier inhibidor que se vaya a someter a prueba a la parte superior, dentro del transwell ("cámara superior"). Se realiza una tripsinización y una re-suspensión de las células que se van a someter a prueba en DMEM + antibióticos y se añaden a la cámara superior del transwell a una concentración final de aprox. 8x10<sup>5</sup> células/mL. El volumen final de la cámara superior se ajusta a 200 µL. La placa ensamblada se incuba a continuación en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% húmeda durante 72 horas aprox. Después de la incubación, se procede a la fijación y tinción de las células con DiffQuik® (tinción Giemsa) y a continuación se frota la cámara superior con un bastoncillo de algodón para retirar el Matrigel® y las células que no penetraron por la membrana. Las membranas se desprenden del transwell utilizando una cuchilla X-acto®, montada sobre platinas utilizando Permout® y cubreobjetos, y luego se recuentan al microscopio utilizando alta resolución (por ej. 400x). Se calcula un número medio de células invasivas a partir de 5-10 campos recontados y se representan como una función de la concentración de inhibidor.

#### 8.3.3. Ensayos de formación en tubo de actividad angiogénica

ECs, por ejemplo, células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC) o células endoteliales

microvasculares humanas (HMVEC) que pueden prepararse o obtenerse comercialmente, se mezclan a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/mL con fibrinógeno (5 mg/mL en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en una proporción de 1:1 (v/v). Se añade trombina (5 unidades / mL concentración final) y la mezcla se transfiere inmediatamente a un placa de 24 pocillos (0,5 mL por pocillo). Se deja que se forme el gel de fibrina y luego se añade VEGF y bFGF a los pocillos (cada uno a 5 ng/mL de concentración final) junto con el compuesto de la prueba. Las células se incuban a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 4 días y pasado ese tiempo se cuentan las células de cada pocillo y se clasifican como redondeadas, alargadas sin ramificaciones, alargadas con una ramificación o alargadas con 2 o más ramificaciones. Los resultados se expresan como la media de 5 pocillos diferentes por cada concentración de compuesto. Normalmente, en presencia de los inhibidores angiogénicos, las células siguen siendo o bien redondeadas o forman tubos indiferenciados, por ej., 0 o 1 ramificación). Este ensayo está considerado predictivo de la eficacia angiogénica (o anti-angiogénica) in vivo (Min et al., Cancer Res. 1996, 56: 2428-2433).

En un ensayo alternativo, la formación de tubos EC se observa cuando se cultivan ECs en Matrigel® (Schnaper HW et al., J. Cell. Physiol. 1995, 165:107-118).  $10^4$  EC/pocillo se transfieren a placas de 24 pocillos recubiertas de Matrigel® y se cuantifica la formación de tubos después de 48 horas. Los inhibidores se someten a prueba añadiéndolos o bien en el momento de añadir los ECs o en diversos momentos a continuación. La formación de tubos también puede ser estimulada añadiendo (a) un factor de crecimiento angiogénico como bFGF o VEGF, (b) un agente estimulador de la diferenciación (por ej., PMA) o (c) una combinación de los mismos.

Sin ánimo de ceñirnos a ninguna teoría en concreto, este ensayo modela la angiogénesis presentando a las ECs un tipo particular de membrana de base, a saber, la capa de matriz que se supone que las ECs migrantes y diferenciadoras encontrarían en primer lugar. Además de factores de crecimiento unidos a matriz, los componentes de matriz encontrados en Matrigel® (y en membranas de base in situ), o los productos proteolíticos del mismo, también pueden ser estimulantes para la formación de tubos lo cual convierte este modelo en complementario del modelo de angiogénesis de gel de fibrina previamente descrito (Blood, CH et al., Biochim. Biophys. Acta 1990, 1032:89-118; Odedra, R et al., Pharmac. Ther. 1991, 49:111-124).

#### 8.3.4. Ensayos para la inhibición de la proliferación celular

La capacidad de los Abs y/o conjugados de esta descripción de inhibir la proliferación de ECs puede determinarse en un formato de 96 pocillos. El colágeno de tipo I (gelatina) se utiliza para recubrir los pocillos de la placa (0.1-1 mg/mL en PBS, 0.1 mL por pocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente). Después de lavar la placa (3x usando PBS), se siembran  $3-6 \times 10^3$  células por pocillo y se deja que se fijen durante 4 horas (37°C/5% CO<sub>2</sub>) en Medio de Crecimiento Endotelial (EGM; Clonetics) o medio M199 complementado con FBS 0.1-2%. El medio y las células fijadas se retira al cabo de 4 horas y se añade a cada pocillo medio nuevo complementado con FbFGF (1-10 ng/mL) o VEGF (1-10 ng/mL). Por último se añaden anticuerpos y/o conjugados a someter a prueba y se deja incubar la placa durante 24-48 horas (37°C/5% CO<sub>2</sub>). El compuesto cromogénico MTS (Promega) se añade a cada pocillo y se deja incubar de 1 a 4 horas. El desarrollo del color en cada pocillo es directamente proporcional al número de células, sirviendo por lo tanto como sustituto para recontar células. La absorbencia leída a 490nm se utiliza para determinar las diferencias en números de células, es decir, proliferación, entre pocillos de control y los que contienen Abs de prueba y/o conjugados.

También se puede utilizar un ensayo similar empleando células tumorales adherentes cultivadas. Sin embargo, en este formato puede omitirse el colágeno. Se siembran las células tumorales (por ej.,  $3-10 \times 10^3$ /pocillo) y se deja que se adhieran durante la noche. A continuación se añade medio libre de suero y se fuerza a las células a sincronizar durante 24 horas. Luego se añade medio + FBS al 10% a cada pocillo para estimular la proliferación. En algunos pocillos se incluye anticuerpos y/o conjugados a someter a prueba. Después de 24 horas se añade MTS a la placa y el ensayo se desarrolla y lee como se ha mencionado

#### 8.3.5. Ensayos de citotoxicidad

Los efectos citotóxicos y anti-proliferativos de Abs y/o sus conjugados pueden determinarse para varios tipos de células incluyendo células tumorales, ECs, fibroblastos y macrófagos. Esto es especialmente útil cuando se somete a prueba un Ab que ha sido conjugado con una porción terapéutica como una toxina o una radioterapéutica. Por ejemplo, se espera que un conjugado de uno de los Abs de la descripción con reactivo Bolton-Hunter que ha sido yodado con <sup>131</sup>I inhiba la proliferación de células que expresan uPAR (más probablemente induciendo apoptosis). Se esperan efectos anti-proliferativos contra células tumorales y células endoteliales estimuladas pero, en algunas circunstancias contra células endoteliales no quiescentes o fibroblastos dérmicos humanos normales. Cualquier efecto anti-proliferativo o citotóxico observado en las células normales puede representar toxicidad no específica del conjugado.

Un ensayo típico implicaría la siembra de células a una densidad de 5-10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. El compuesto a someter a prueba se añade a una concentración  $10 \times IC_{50}$  medido en un ensayo de unión (esto variará en función del conjugado) y se dejará incubar con las células durante 30 minutos. Las células se lavan 3X con medio, luego se añade medio fresco que contenga (<sup>3</sup>H]timidina (1 µCi/mL) a las células y se dejan incubar a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> durante 24 y 48 horas. Las células son lisadas en diversos momentos utilizando 1 M NaOH y se

hacen recuentos por pocillo utilizando un contador-β. La proliferación puede medirse no radioactivamente utilizando reactivo MTS o CyQuant® para medir el número total de células. Para ensayos de citotoxicidad (medición de lisis celular), se utiliza un kit de citotoxicidad de 96 pocillos Promega. Si hay pruebas de actividad anti-proliferativa, se puede medir la inducción de apoptosis utilizando TumorTACS (Genzyme).

5

### 8.3.6. Ensayo de actividad de la caspasa-3

La capacidad de los Abs y/o conjugados de promover la apoptosis de ECs puede determinarse midiendo la activación de la caspasa-3. Se utiliza colágeno de tipo I (gelatina) para recubrir una placa P100 y se siembran  $5 \times 10^5$  ECs en EGM + FBS 10%. Después de 24 horas (a 37°C/5% CO<sub>2</sub>) el medio se reemplaza por EGM + FBS 2%, 10 ng/ml bFGF y el compuesto de prueba deseado. Las células se recolectan después de 6 horas, se preparan lisados celulares en detergente Triton X-100 1% y los lisados se valoran utilizando el Kit de Ensayo EnzChek®Caspase-3 (probetas moleculares) según las instrucciones del fabricante.

10

15

### 8.3.7. Modelos de xenoinjertos de crecimiento de tumor subcutáneo

#### *Carcinoma ovárico humano*

Se estableció una línea de cáncer ovárico humano A2780 a partir de tejido tumoral de una paciente no tratada. Las células A2780 se mantienen como una monocapa en medio RPMI 1640 complementado con 2 mM glutamina, 0,01 mg/mL de insulina bovina, y FBS al 10%. (Hamilton, TC et al., Sem. Oncol. 1984; 11:285-293; Behrens, BC et al., Cancer Res. 1987; 47:414-418). Se inocularon dos millones de A2780 en el flanco derecho de ratones desnudos hembras Balb/c. El tumor A2780 se programa en estadios del rango de 50 a 200 mm<sup>3</sup> antes de administrar el tratamiento. El Ab de control de IgG así como los mAbs de uPAR anti-D2D3 se administran por vía intraperitoneal a 10 mg/kg dos veces por semana el lunes y el viernes. El grupo de tratamiento con cisplatina fue programado a 1000 mm<sup>3</sup>; los animales recibieron 6 mg/kg una vez a la semana. El volumen de los tumores se midió dos veces por semana. En el momento del sacrificio, se obtuvo plasma y se extirpó el tumor de cada animal. La mitad del tumor se congeló inmediatamente para su evaluación bioquímica y el resto se colocó en fijador de cinc para su evaluación histológica.

20

25

30

#### *Carcinoma pulmonar humano*

Se estableció una línea celular (ATCC Catálogo No. CCL-185) de carcinoma pulmonar humano, A549, a través de un explante de tejido carcinomatoso pulmonar de un hombre caucásico de 58 años (Giard, DJ et al., J. Natl. Cancer Inst. 51:1417-23 (1973)). Células A549 se mantienen en medio F12K de Ham complementadas con 2 mM L-glutamina, 0,15% de NaHCO<sub>3</sub>, y FBS al 10%.

35

Aproximadamente 10<sup>6</sup> células de carcinoma A549 se inoculan en el flanco derecho de ratones hembra (SCID) con inmunodeficiencia combinada grave C.B-17/Sys *scid/scid*. El tratamiento se inicia preferentemente el día después de la inoculación del tumor. El Ab de control de IgG (y el control de PBS) así como el mAbs de uPAR anti-D2D3 ATN-658 se administran por vía intraperitoneal a 10 mg/kg dos veces por semana el lunes y el viernes. Inicialmente el volumen del tumor se mide una vez a la semana. Cuando el volumen en el grupo de tratamiento excede de 300 mm<sup>3</sup>, las mediciones se obtienen dos veces por semana.

40

45

En el momento del sacrificio, se obtuvo plasma y se extirpó el tumor de cada animal. La mitad del tumor se congeló inmediatamente para su evaluación bioquímica y el resto se colocó en fijador de cinc para su evaluación histológica.

### 8.3.8. Modelo de xenoinjerto de metástasis

Abs y/o conjugados se someten a prueba de inhibición de metástasis tardía utilizando un modelo de metástasis experimental como el de Crowley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90 5021-5025). La metástasis tardía implica las etapas en que las células tumorales se fijan y extravasan, invaden localmente, se siembran, proliferan e inducen angiogénesis. Se inoculan en ratones desnudos células de carcinoma prostático humano (PC-3) transfectadas con un gen marcador, preferiblemente gen de proteína fluorescente verde (GFP), pero como alternativa con un gen que codifica las enzimas cloranfenicol acetil-transferasa (CAT), luciferasa o LacZ. Este método permite la utilización de cualquiera de estos marcadores (detección por fluorescencia de GFP o detección colorimétrica histoquímica de varias enzimas) para seguir el destino de estas células. Se inyectan las células, preferentemente iv, y se identifican las metástasis al cabo de 14 días aproximadamente, particularmente en los pulmones pero también en nodos linfáticos regionales, fémures y cerebro. Esto simula el tropismo orgánico de las metástasis que se producen de forma natural en el cáncer de próstata humano. Por ejemplo, se inyectan células PC-3 que expresan GFP (10<sup>6</sup> células por ratón) en las venas de la cola de ratones desnudos (*nu/nu*). Los animales son tratados con una composición de prueba a 100µg/animal/día. IP. Células y focos metastásicos se visualizan y cuantifican mediante microscopia de fluorescencia o histoquímica por microscopia óptica o se tritura el tejido y se realiza un ensayo colorimétrico cuantitativo de la etiqueta detectable.

50

55

60

65

## 9. Kits



La divulgación proporciona un pack o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes rellenos de un anticuerpo uPAR de la divulgación. Adicionalmente, también se puede incluir uno o más de otros agentes terapéuticos o profilácticos para el tratamiento del cáncer en el pack o kit farmacéutico. La divulgación también presenta un pack o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la divulgación. De manera opcional, dichos recipientes pueden ir acompañados de (a) un aviso en la forma prescrita por una agencia del gobierno que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, aviso que recoge la autorización de la agencia de la fabricación, uso o venta para administración a humanos.

La presente divulgación presenta kits que pueden utilizarse en los métodos mencionados. En un modo de realización, un kit comprende uno o más anticuerpos uPAR de la divulgación. En otro modo de realización, el kit también comprende uno o más agentes terapéuticos o profilácticos útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más recipientes. En ciertos modos de realización, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente quimioterapéutico. En otros modos de realización, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico hormonal o biológico.

## 10. Métodos generales

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

En la divulgación, se hace referencia a diversas metodologías conocidas por aquellos competentes en el ámbito de la inmunología, biología celular y biología molecular. Obras de referencia estándar que establecen los principios generales de la inmunología incluyen Abbas, AK et al., *Cellular and Molecular Immunology* (Fourth Ed.), W. B. Saunders Co., Philadelphia, 2000; Janeway, CA et al., *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease*, 4th ed., Garland Publishing Co., New York, 1999; Roitt, I et al., *Immunology*, (current ed.) C. V. Mosby Co., St. Louis, MO (1999) ; Klein, J, *Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Inc., Cambridge, MA, (1990).

A menos que se indique lo contrario, se entiende que una secuencia de ácido nucleico particular comprende variantes de sustitución conservadora del mismo, por ej. sustituciones de codones degenerados y una secuencia complementaria. El término "ácido nucleico" es sinónimo de "polinucleótido" e incluye un gen, una molécula ADNc, una molécula de ARNm, así como un fragmento de cualquiera de ellas como un oligonucleótido, y además, sus equivalentes (se explica con más detalle más adelante). Los tamaños de los ácidos nucleicos se indican o bien como kilobases (kb) o bien como pares de bases (bp). Son estimaciones derivadas de electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa (PAGE), de secuencias de ácido nucleico que son determinadas por el usuario o están publicadas. El tamaño de la proteína se indica como masa molecular en kilodaltons (kDa) o como longitud (número de residuos de aminoácidos). El tamaño de la proteína se estima a partir de PAGE, por secuenciación, a partir de presuntas secuencias de aminoácidos basadas en la secuencia de ácido nucleico codificadora o de secuencias de aminoácidos publicadas.

De manera específica, las moléculas de ADN que codifican la secuencia de aminoácidos correspondiente a los polipéptidos de la presente invención, o variantes activas los mismos, pueden sintetizarse por la reacción de cadena de polimerasa (PCR) (ver, por ejemplo, Patente U.S. N° 4,683,202) usando iniciadores derivados de la secuencia de la proteína divulgada aquí. Estas secuencias de ADNc pueden ensamblarse a un vector de expresión de eucariotas y procariotas y el vector resultante puede ser utilizado para dirigir la síntesis del polipéptido de fusión o su fragmento o derivado por las células huésped adecuadas, por ej., células COS o CHO.

Las secuencias de ácido nucleico de esta divulgación pueden ser ADN o ARN.

Células huéspedes eucariotas o procariotas transformadas o transfectadas para expresar los presentes polipéptidos entran dentro del alcance de la divulgación. Por ejemplo, el polipéptido puede expresarse en células bacterianas como *E. coli*, células de insectos (báculovirus), levadura, o células de mamífero como células de ovario de hámster chino (CHO) o células humanas (que son preferibles para uso terapéutico humano de células transfectadas). Los expertos en el campo conocen otros huéspedes adecuados. La expresión en células eucariotas conduce a glicosilación parcial o completa y/o formación de enlaces disulfuro inter o intra-cadena relevantes del polipéptido recombinante. Ejemplos de vectores para expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec (Baldari et al., 1987, *EMBO J.* 6: 229-234), pMFa (Kurjan et al. 1982 *Cell* 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al., 1987, *Gene* 54: 113-123), and pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.). Vectores de báculovirus disponibles para expresión de proteínas en células de insectos cultivadas incluyen la serie pAc (Smith et al., 1983, *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) y la

serie pVL (Lucklow et al., (1989) *Virology* 170:31-39). En general, se utilizan células COS (Gluzman 1981 *Cell* 23:175-182) en conjunción con vectores como pCDM 8 (Aruffo *et al.*, *supra*, para expresión/amplificación transiente en células de mamífero, mientras que las células CHO (CHO dhfr-negativo) se utilizan con vectores como pMT2PC (Kaufman et al., 1987, *EMBO J.* 6: 187-195) para la amplificación/expresión estable en células de mamífero. La línea de células de mieloma NSO (un sistema de expresión de glutamina sintetasa) está disponible en Celltech Ltd.

La construcción de vectores adecuados que contengan las secuencias de control y codificación deseadas emplea técnicas de restricción y ligadura estándar que son bien conocidas en el estado de la técnica. Plásmidos aislados, secuencias de ADN o oligonucleótidos sintetizados son escindidos, adaptados o religados en la forma deseada. Las secuencias de ADN que forman los vectores están disponibles en una serie de fuentes.

Vectores determinantes y sistemas de control se encuentran por lo general en vectores "huésped" disponibles que se utilizan para el grueso de las secuencias en construcción. Para la secuencia de codificación pertinente, la construcción inicial puede ser, y generalmente es, una cuestión de recuperar las secuencias adecuadas de bibliotecas de ADN genómico o ADNc. Sin embargo, una vez que la secuencia es revelada, es posible sintetizar la secuencia entera de genes *in vitro* empezando por los derivados de nucleótidos individuales. La secuencia entera de genes para genes de longitud en el rango de 500-1000 bp puede prepararse sintetizando oligonucleótidos complementarios superpuestos individuales y rellenando porciones no superpuestas monocatenarias utilizando ADN polimerasa en presencia de los trifosfatos deoxiribonucleótidos. Este enfoque se ha utilizado con éxito en la construcción de varios genes de secuencia conocida. Ver, por ejemplo, Edge, *Nature* 1981, 292:756; Nambair et al., *Science* 1984, 223:1299; and Jay, *J. Biol. Chem.* 1984, 259:6311. Oligonucleótidos sintéticos se preparan mediante métodos descritos en referencias citadas anteriormente o por Beaucage et al., *Tetrahedron Lett.* 1981, 22:1859; and Matteucci et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103:3185.

Los componentes de los vectores deseados pueden escindir o ligarse utilizando procedimientos de ligadura y restricción estándar. La escisión de ADN de un sitio específico se realiza tratando con la enzima de restricción adecuada (o enzimas) en condiciones que se conocen por lo general en la materia, y cuyos detalles son especificados por el fabricante de estas enzimas de restricción disponibles en el comercio. Ver, por ej., *New England Biolabs, Product Catalog*. Si se desea, la separación por tamaños de los fragmentos escindidos puede realizarse mediante técnicas estándar de electroforesis en gel de agarosa o gel de poliacrilamida, por ej. *Meth. Enzymol.* (1980) 65:499-560).

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

ADN vector puede introducirse en células de mamífero mediante técnicas convencionales como co-precipitación de cloruro de calcio o fosfato de calcio, transfección mediada por dextrano-DEAE, lipofección o electroporación. Métodos adecuados para transformar células huésped pueden encontrarse en Sambrook et al. *supra* y otros textos estándar. En vectores de expresión de fusión, un sitio de escisión proteolítica es introducido en el empalme del grupo marcador y la proteína de destino para permitir la separación de la proteína de destino del grupo marcador después de la purificación de la proteína de fusión. Enzimas proteolíticas para dicha escisión y sus secuencias de reconocimiento incluyen Factor Xa, trombina y enteroquinasa.

Después de haber descrito la invención de manera general, se entenderá mejor mediante la referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención, a menos que se especifique.

## Ejemplos

### 1. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1.1. Líneas de células que expresan proteínas

El sistema de expresión de *Drosophila* (DESTM; Invitrogen, Inc.) utiliza la línea de células Schneider 2 (S2), derivada de *Drosophila melanogaster*, y vectores plasmídicos para la expresión de proteínas heterólogas. Los vectores plasmídicos para expresión en células S2 son muy versátiles, permitiendo la expresión inducible de una proteína producida por el promotor de metaloteioneína (MT). El mismo plásmido también permite que la proteína sea secretada de la célula a los medios circundantes, simplificando grandemente la purificación de la proteína. Copias múltiples del vector pueden ser insertadas establemente en el ADN genómico de células S2, incrementando los niveles de expresión de proteínas. Las proteínas expresadas en células S2 están mínimamente glicosiladas lo cual

es importante para la generación de Abs dirigidos contra el componente proteína de uPAR. Productos típicos de proteínas después de purificación son 25-50 mg/L con una pureza del 95 por ciento aproximadamente. Se han generado líneas de células que expresan las siguientes proteínas: suPAR, D1, D2D3, scuPA, ATF1-143, ATF1-135, Kringle47-143, and Kringle47-135. Además, se han generado clones para suPAR en los que se han abolidos los sitios de N-glicosilación.

## 1.2. Reactivos

$^{125}\text{I}$  fue adquirido como  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (480-630 MBq [13-17 mCi] por  $\mu\text{g}$  de yodo) de Amersham Corp.

## 1.3. Líneas de células tumorales

Se utilizaron las siguientes líneas de células y tumores: A549, HeLa, y A2780. Se estableció una línea de cáncer ovárico humano A2780 a partir de tejido tumoral de una paciente no tratada. Las células A2780 se mantienen como una monocapa en medio RPMI 1640 complementado con 2 mM glutamina, 0,01 mg/mL de insulina bovina, y FBS al 10%. Ver supra. Carcinoma pulmonar humano, A549, ATCC Catálogo N° CCL-185, descrito más arriba, se mantiene en medio F12K de Ham complementado con 2 mM L-glutamina, 0.15%  $\text{NaHCO}_3$ , y FBS al 10%.

Células A2780 ( $2 \times 10^6$ ) fueron inoculadas en el flanco derecho de ratones desnudos hembra Balb/c. El tumor fue programado en estadios del rango de 50 a 200  $\text{mm}^3$  antes de iniciar el tratamiento. El anticuerpo de control de IgG así como los mAbs de uPAR anti-D2D3 fueron administrados por vía intraperitoneal a 10 mg/kg dos veces por semana el lunes y el viernes. El grupo de tratamiento con cisplatina fue programado a 1000  $\text{mm}^3$ ; los animales recibieron 6 mg/kg una vez a la semana. El volumen de los tumores se midió dos veces por semana.

Células de carcinoma A549 ( $10^6$ ) fueron inoculadas en el flanco derecho de ratones hembra C.B-17/Sys (*scid/scid*) (*scid*: Inmunodeficiencia combinada grave). El tratamiento se inició al día siguiente de la inoculación del tumor. El Ab de control de IgG (y el control de PBS) así como el mAb de uPAR anti-D2D3 ATN-658 fueron administrados por vía intraperitoneal a 10 mg/kg dos veces por semana el lunes y el viernes. Inicialmente los volúmenes del tumor se midieron una vez a la semana. Cuando el volumen en el grupo de tratamiento excedió de 300  $\text{mm}^3$ , las mediciones se obtuvieron dos veces por semana.

En el momento del sacrificio, se obtuvo plasma y se extirpó el tumor de cada animal. La mitad del tumor se congeló inmediatamente para su evaluación bioquímica y el resto se colocó en fijador de cinc para su evaluación histológica.

## 2. Unión de uPA a uPAR

La unión de uPA a uPAR se midió utilizando células uPA y HeLa etiquetadas- $^{125}\text{I}$  (ver Figura 2). Las células HeLa expresan cantidades abundantes de uPAR pero no expresan uPA. En resumen, 100 pg de scuPA fue etiquetado con 100 pCi de [ $^{125}\text{I}$ ]NaI utilizando reactivo de yodación Iodo-Gen™ (Pierce Biotechnology Inc.). El NaI etiquetado no incorporado se retiró de la proteína etiquetada utilizando una columna de exclusión por tamaño y la proteína etiquetada eluida en solución salina tamponada con Tris conteniendo albúmina de suero bovino al 0,1%. Se incubaron células HeLa con concentraciones crecientes de [ $^{125}\text{I}$ ]-scuPA diluido en PBS conteniendo BSA al 0,1% durante 2 horas a 4° C. Las células se lavaron a fondo con PBS/0.1% BSA, las monocapas de células lisadas con 1M NaOH y se determinó el número total de uniones. Se determinó la unión específica incubando células con [ $^{125}\text{I}$ ]-scuPA en presencia de un gran exceso de scuPA no etiquetado. La unión también se realizó con células MDA-MB231 que expresan tanto uPA como uPAR. Para determinar la unión de scuPA, se retira primero el uPA endógeno de la superficie de células MDA-MB231 lavando con un tampón que contenga 0,1 M glicina/100 mM NaCl, pH 3 durante 5 minutos a 4° C. Este protocolo también se utilizó para determinar la unión de [ $^{125}\text{I}$ ]-ATF a células HeLa. La capacidad de Abs de inhibir la unión de [ $^{125}\text{I}$ ]-scuPA o la unión de [ $^{125}\text{I}$ ]-ATF a células HeLa se determinó incubando células con cantidades crecientes de Ab no etiquetado durante 15 minutos a 4° C, antes de la adición de la proteína etiquetada- [ $^{125}\text{I}$ ].

ATN-658 no inhibe la unión de scuPA a uPAR (Figura 2) en la superficie de células HeLa y es capaz de unirse a células HeLa en presencia de scuPA. Por lo tanto, ATN-658 puede dirigirse tanto a receptores ocupados y no ocupados en la superficie de la célula.

La unión de scuPA a uPAR también fue medida utilizando células HeLa y scuPA biotinilado. En resumen, se sembró células HeLa en una placa de 24 pocillos a 150.000 células por pocillo 24 horas antes de realizar el ensayo de unión. Se preparó 3 ml de 30 nM biotina-ATN-615, 3 ml de 30 nM biotina-ATN-658 y 3 mL de 100 nM biotina-scuPA y se diluyeron en serie con 2 ml de tampón por cada 1 ml de reactivo. Las células HeLa sembradas se lavaron 2 veces con 1 ml de tampón de lavado (1xHBSS/0.1% BSA) seguido de incubación con biotina-scuPA, biotina-ATN-658 o biotina-ATN-615 durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón de unión (1xHBSS/0.1% BSA). Se puede añadir ATN-658, ATN-617, o scuPA sin etiquetar para valorar la unión competitiva y no específica. Las células se lavaron luego dos veces con 1 ml de tampón de lavado. Se añadió 250 pl Avidina-HRP (1 pl en 20 ml de tampón) a cada pocillo y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados. A continuación, se añadió sustrato OPD (250 pl) a cada pocillo, y se dejó que se formara un color amarillo antes de detener la reacción

con 50  $\mu$ l 1M  $H_2SO_4$  (para placa de 24 pocillos) Se hicieron lecturas a OD 490 nm para analizar el color de cada pocillo de la placa.

### 3. Actividades de mAbs in vivo

Se sometió a prueba la capacidad de anticuerpos de inhibir el crecimiento de tumores in vivo en dos modelos: el modelo de cáncer pulmonar humano de células no pequeñas A549 y el modelo de cáncer ovárico A2780 utilizando los protocolos y condiciones descritas en la Sección 6.1. El tratamiento se inició al día siguiente de la inoculación del tumor. El Ab de control de IgG (y el control de PBS) así como el mAb de uPAR anti-D2D3 ATN-658 se administraron por vía intraperitoneal a 10 mg/kg dos veces por semana el lunes y el viernes.

### 4. Identificación de epítomos ATN-658

Cada uno de los residuos de mono verde no homólogos fue cambiado al correspondiente residuo humano, es decir, el aminoácido 125 fue cambiado de M a V; el aminoácido 192 fue cambiado de H a R, etc.). Todos los números de aminoácidos hacen referencia a la forma procesada madura de uPAR humano, es decir, después de eliminar el péptido señal de aminoácido 22. Los efectos de estos cambios fueron evaluados para ver la capacidad de ATN-658 de inmunoprecipitar el suPAR de mono mutado después de expresión transiente en células S2. La única mutación que restauró la unión fue cuando el aminoácido 268 fue mutado de E a K (ver Figura 5B). Dado que mutar los aminoácidos 262 y 264 no tuvo efecto sobre la unión de ATN-658 a uPAR de mono, el extremo N del epítomo fue definido como aminoácido 265. La mutagénesis de exploración con alanina de uPAR humano empezando en aminoácido 267 identificó aminoácidos 268 (K) a 277 (D) como parte del epítomo (ver Figura 6). Ver, Vajdos et al., 2002, J Mol Biol. 320(2):415-28; Nisihara et al., 2001, J Immunol. 167(6):3266-75; and Zhang et al., 1999, Int Immunol. 11 (12):1935-44. Mutar aminoácidos 268 (K), 273 (H), 275 (D), or 277 (D) en Ala en uPAR humano tuvo como resultado la unión reducida de ATN-658 al uPAR humano mutado como se demuestra en ensayos de co-inmunoprecipitación. Aunque el epítomo parece estar contiguo, puede ser un epítomo dependiente de conformación ya que la reducción destruye la capacidad de uPAR de ser reconocido por ATN-658. Probablemente es debido al hecho de que hay un enlace disulfuro dentro del epítomo (Cys266-Cys271) que parece estabilizar el epítomo. La secuencia del epítomo se establece a continuación.

C C T K S G C N H P D L D V Q Y R S G (SEQ ID NO: 9)

Esta secuencia representa aminoácidos 265-283 de la secuencia uPAR humano maduro. El epítomo se puede detener en Q279 dado que los aminoácidos 280-283 parecen ser flexibles y no son visibles en la estructura de cristal.

Una secuencia adicional que comprende aminoácidos 98-114 de uPAR maduro fue identificada utilizando espectrometría de masas por intercambio de deuterio. Ver Hamuro et al., 2006, Protein Sci. 15(8): 1883-92; Baerga-Ortiz et al., 2002, Protein Sci. 11(6):1300-8. La secuencia del epítomo se establece a continuación:

C G S S D M S C E R G R H Q S L Q (SEQ ID NO: 14)

Este método mide el intercambio de deuterio de una proteína en presencia y ausencia de un anticuerpo. La unión de un anticuerpo a un epítomo en una proteína disminuye la capacidad de ese epítomo de intercambiar deuterio y una comparación de digestas proteolíticas de una proteína que experimenta intercambio de deuterio en presencia o ausencia de anticuerpo utilizando espectrometría de masas localiza el epítomo que está unido, al detectar el intercambio de deuterio reducido en el epítomo (ver Figura 7A). Por lo tanto, el intercambio de deuterio de suPAR D2D3 fue analizado por espectrometría de masas en presencia y ausencia de ATN-658. Las Figuras 7B y 7C presentan los resultados obtenidos de dos experimentos independientes de intercambio de deuterio. En las Figuras 7B y 7C se muestra el nivel de deuteración detectado en cada residuo aminoácido de suPAR D2D3 en presencia y ausencia de ATN-658. También se muestra la diferencia en los niveles de deuteración detectado en cada residuo aminoácido de suPAR D2D3 en presencia y ausencia de ATN-658. Se identificaron dos secuencias de epítomos que tuvieron el grado más elevado de protección en presencia de ATN-658: una región que abarca aminoácidos 268-277 (SEQ ID NO: 16) (que está incluida en el epítomo identificado utilizando mutagénesis dirigida a un sitio) y una segunda región que abarca aminoácidos 98-114 (SEQ ID NO: 14) (ver Figuras 7B y 7C). En particular, la región que abarca aminoácidos 268-277 (SEQ ID NO: 16) poseía las mayores diferencias en el nivel de deuteración en presencia y ausencia de ATN-658 con relación al resto de regiones de suPAR D2D3.

### 5. Ensayo para anticuerpos que reconocen el mismo epítomo que ATN-658 utilizando ATN-658 biotilado

El anticuerpo anti-D2D3, ATN-658, es biotilado utilizando EZ-link<sup>TM</sup> sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce Biotechnology Inc.) según instrucciones del fabricante. Normalmente, un exceso molar de 20 veces el reactivo que etiqueta la biotina se utiliza para etiquetar ATN-658 y la biotina no incorporada se retira del Ab etiquetado utilizando una columna de exclusión por tamaño. Para garantizar que el anticuerpo etiquetado retuvo su afinidad a uPAR, se somete a prueba Biotina-ATN-658 en ensayo ELISA para unión a suPAR. Se detecta Biotina-ATN-658 unida utilizando estreptavidina conjugada-HRP. Se realiza un ensayo de competición para identificar anticuerpos que

reconozcan el mismo epítipo como ATN-658. En resumen, placas con elevada unión a proteínas EIA/RIA de 96 pocillos se recubren con 100 ng/pocillo de suPAR durante la noche a 4° C. Después del bloqueo de unión no específica con caseína al 1%, se lavan las placas con PBS y los anticuerpos a someter a prueba, diluidos en PBS/caseína al 0.1% conteniendo 0,2 nM de Biotina-ATN-658, se añaden a los pocillos apropiados. Se incuban las placas durante otra hora más a temperatura ambiente, se lavan a fondo con PBS/0.05% Tween-20 y se detecta la Biotina-ATN-658 unida utilizando estreptavidina conjugada-HRP y el sustrato apropiado.

Los expertos en la materia reconocerán, o será capaces de averiguar no utilizando más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes de los modos de realización específicos de la invención descritos aquí. Se pretende que tales equivalentes estén incluidos en las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Attenuon, LLC

<120> EPÍTIPO RECEPTOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TIPO UROQUINASA, ANTICUERPOS MONOCLONALES DERIVADOS DEL MISMO Y MÉTODOS DE USO

<130> 9715-051-228

<140>

<141>

<150> 60/873,627 <151> 2006-12-08

<150> 60/930,034 <151> 2007-05-11

<160> 16

<170> FastSEQ Windows 4.0

<210> 1

<211> 141

<212> PRT

<213> ratón

<220>

<223> región variable de cadena ligera de anticuerpo ATN-658

<400> 1

```

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1          5          10          15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20          25          30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35          40          45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50          55          60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85          90          95
Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100         105         110
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115         120         125
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
 130         135         140
    
```

<210> 2

<211> 141

<212> PRT

ES 2 636 451 T3

<213> ratón

<220>

<223> región variable de cadena pesada de anticuerpo ATN-658

5

<400> 2

```

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Ala
 1           5           10           15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
           20           25           30
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Glu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Ile
 50           55           60
Lys Gly Arg Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Arg Thr Ala Tyr
 65           70           75
Met Gln Phe Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Ser Ile Tyr Gly His Ser Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
           100           105           110
Thr Ser Val Ser Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
           115           120           125
Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met
           130           135           140
    
```

10

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> CDR L1 of ATN-658

<400> 3

20

```

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

25

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> CDR L2 de ATN-658

<400> 4

```

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1           5
    
```

35

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> CDR L3 de ATN-658

45

<400> 5

ES 2 636 451 T3

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Leu Thr  
 1 5

5 <210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> CDR H1 of ATN-658  
 <400> 6

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His  
 1 5 10

15 <210> 7  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> CDR H2 of ATN-658  
 <400> 7

Glu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Ile Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

25 <210> 8  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> CDR H3 de ATN-658  
 <400> 8

Ser Ile Tyr Gly His Ser Val Leu Asp Tyr  
 1 5 10

35 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <220>  
 <223> aminoácido 265-283 de uPAR humano  
 <400> 9

Cys Cys Thr Lys Ser Gly Cys Asn His Pro Asp Leu Asp Val Gln Tyr  
 1 5 10 15  
 Pro Ser Gly

45 <210> 10  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50 <220>  
 <223> aminoácido 265-282 de uPAR humano  
 <400> 10

ES 2 636 451 T3

Cys Cys Thr Lys Ser Gly Cys Asn His Pro Asp Leu Asp Val Gln Tyr  
 1 5 10 15  
 Pro Ser  
 <210> 11  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> aminoácido 265-281 de uPAR humano  
 <400> 11  
 Cys Cys Thr Lys Ser Gly Cys Asn His Pro Asp Leu Asp Val Gln Tyr  
 1 5 10 15  
 Pro  
 <210> 12  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> aminoácido 265-280 de uPAR humano  
 <400> 12  
 Cys Cys Thr Lys Ser Gly Cys Asn His Pro Asp Leu Asp Val Gln Tyr  
 1 5 10 15  
 <210> 13  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> aminoácido 265-279 de uPAR humano  
 <400> 13  
 Cys Cys Thr Lys Ser Gly Cys Asn His Pro Asp Leu Asp Val Gln  
 1 5 10 15  
 <210> 14  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> aminoácido 98-114 de uPAR humano  
 <400> 14  
 Cys Gly Ser Ser Asp Met Ser Cys Glu Arg Gly Arg His Gln Ser Leu  
 1 5 10 15  
 <210> 15  
 <211> 335  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> uPAR humano (GenBank accession No. Q03405)  
 <400> 15



Met Gly His Pro Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu His Thr Cys  
 1 5 10 15  
 Val Pro Ala Ser Trp Gly Leu Arg Cys Met Gln Cys Lys Thr Asn Gly  
 20 25 30  
 Asp Cys Arg Val Glu Glu Cys Ala Leu Gly Gln Asp Leu Cys Arg Thr  
 35 40 45  
 Thr Ile Val Arg Leu Trp Glu Glu Gly Glu Glu Leu Glu Leu Val Glu  
 50 55 60  
 Lys Ser Cys Thr His Ser Glu Lys Thr Asn Arg Thr Leu Ser Tyr Arg  
 65 70 75 80  
 Thr Gly Leu Lys Ile Thr Ser Leu Thr Glu Val Val Cys Gly Leu Asp  
 85 90 95  
 Leu Cys Asn Gln Gly Asn Ser Gly Arg Ala Val Thr Tyr Ser Arg Ser  
 100 105 110  
 Arg Tyr Leu Glu Cys Ile Ser Cys Gly Ser Ser Asp Met Ser Cys Glu  
 115 120 125  
 Arg Gly Arg His Gln Ser Leu Gln Cys Arg Ser Pro Glu Glu Gln Cys  
 130 135 140  
 Leu Asp Val Val Thr His Trp Ile Gln Glu Gly Glu Glu Gly Arg Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Asp Asp Arg His Leu Arg Gly Cys Gly Tyr Leu Pro Gly Cys Pro  
 165 170 175  
 Gly Ser Asn Gly Phe His Asn Asn Asp Thr Phe His Phe Leu Lys Cys  
 180 185 190  
 Cys Asn Thr Thr Lys Cys Asn Glu Gly Pro Ile Leu Glu Leu Glu Asn  
 195 200 205  
 Leu Pro Gln Asn Gly Arg Gln Cys Tyr Ser Cys Lys Gly Asn Ser Thr  
 210 215 220  
 His Gly Cys Ser Ser Glu Glu Thr Phe Leu Ile Asp Cys Arg Gly Pro  
 225 230 235 240  
 Met Asn Gln Cys Leu Val Ala Thr Gly Thr His Glu Pro Lys Asn Gln  
 245 250 255  
 Ser Tyr Met Val Arg Gly Cys Ala Thr Ala Ser Met Cys Gln His Ala  
 260 265 270  
 His Leu Gly Asp Ala Phe Ser Met Asn His Ile Asp Val Ser Cys Cys  
 275 280 285  
 Thr Lys Ser Gly Cys Asn His Pro Asp Leu Asp Val Gln Tyr Arg Ser  
 290 295 300  
 Gly Ala Ala Pro Gln Pro Gly Pro Ala His Leu Ser Leu Thr Ile Thr  
 305 310 315 320  
 Leu Leu Met Thr Ala Arg Leu Trp Gly Gly Thr Leu Leu Trp Thr  
 325 330 335

5 <210> 16  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <223> aminoácido 268-277 de uPAR humano

<400> 16

15 Lys Ser Gly Cys Asn His Pro Asp Leu Asp  
 1 5 10

20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Péptido aislado de hasta 40 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos CCTKSGCNHPDLVDVQYRSG, CCTKSGCNHPDLVDVQYRS, CCTKSGCNHPDLVDVQYR, CCTKSGCNHPDLVDVQY o CCTKSGCNHPDLVDVQ, donde el segundo y el tercer residuo de cisteína de la secuencia son disulfuros unidos entre sí formando un enlace disulfuro.
- 10 2. Péptido aislado, según la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos CCTKSGCNHPDLVDVQYRSG, CCTKSGCNHPDLVDVQYRS, CCTKSGCNHPDLVDVQYR, CCTKSGCNHPDLVDVQY or CCTKSGCNHPDLVDVQ.
- 15 3. Péptido aislado, según la reivindicación 1, que consiste en un fragmento de uPAR humano como se muestra en la Figura 1.
- 15 4. Péptido aislado, según la reivindicación 1 o 3, donde dicho péptido tiene una longitud de hasta 30 aminoácidos.
- 5 5. Péptido aislado, según la reivindicación 4, donde dicho péptido tiene una longitud de hasta 20 aminoácidos.
- 20 6. Péptido aislado, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-5, cuya secuencia:
  - (i) consiste en un fragmento de uPAR humano en el que Cys 265 es el amino terminal del péptido; y
  - (ii) comprende la secuencia de aminoácidos CCTKSGCNHPDLVDVQYRS, CCTKSGCNHPDLVDVQYR, CCTKSGCNHPDLVDVQY, o CCTKSGCNHPDLVDVQ.
- 25 7. Método para producir un anticuerpo, que comprende:
  - (i) inmunizar a un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
  - (ii) aislar esplenocitos de dicho mamífero;
  - 30 (iii) fusionar dichos esplenocitos a células de mieloma; y
  - (iv) seleccionar un hibridoma que secreta un anticuerpo que se une a dicho péptido.

10            20            30            40            50            60  
 MGHPPLLPLL LLLHTCVPAS WGLRCMQCKT NGDCRVEECA LGQDLCRTTI VRLWEEGEEL  
 70            80            90            100           110           120  
 ELVEKSCTHS EKTNRTLSYR TGLKITSLTE VVCGLDLCNQ GNSGRAVTYS RSRYLECISC  
 130           140           150           160           170           180  
 GSSDMSCERG RHQSLQCRSP EEQCLDVVTH WIQEGEEGRP KDDRHLRGCG YLPGCPGSNG  
 190           200           210           220           230           240  
 FHNNDTFHFL KCCNTTKCNE GPILELENLP QNGRQCYSCK GNSTHGCSSE ETFLIDCRGP  
 250           260           270           280           290           300  
 MNQCLVATGT HEPKNQSYMV RGCATASMCQ HAHLGDAFSM NHIDVSCCTK SGCNHPDLDV  
 310           320           330  
 QYRSGAAPQF GPAHLSLTIT LLMTARLWGG TLLWT

**FIG. 1**

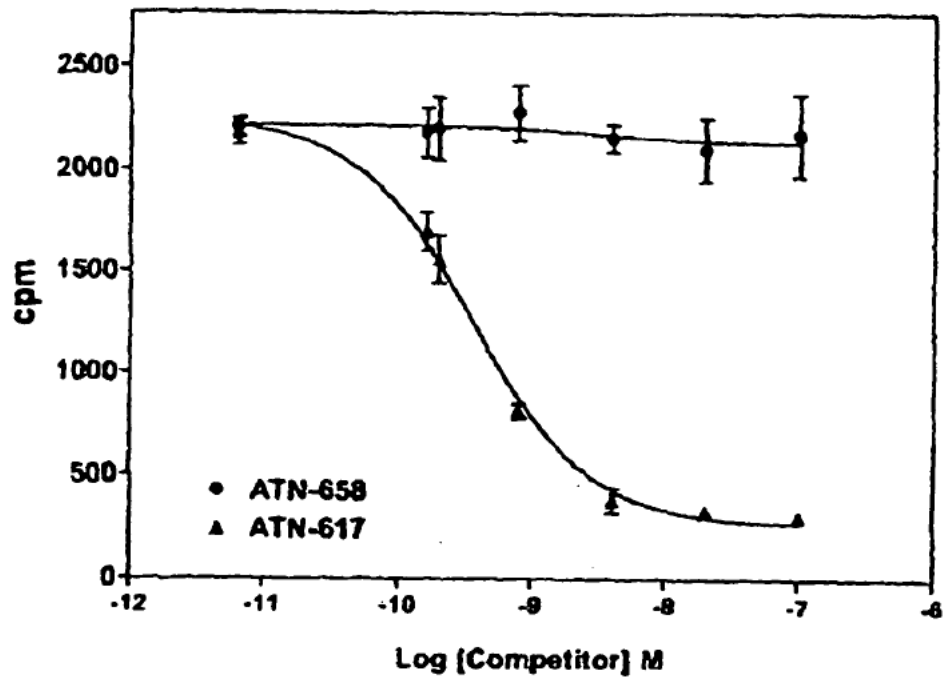


FIG. 2

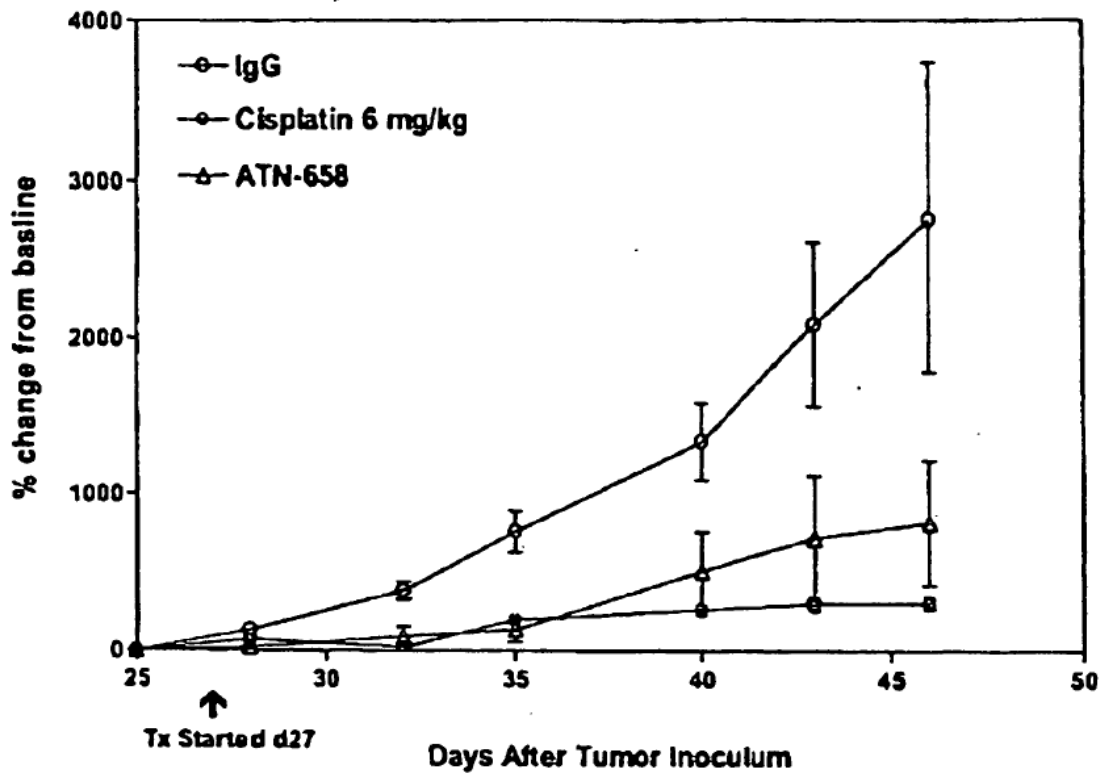


FIG. 3

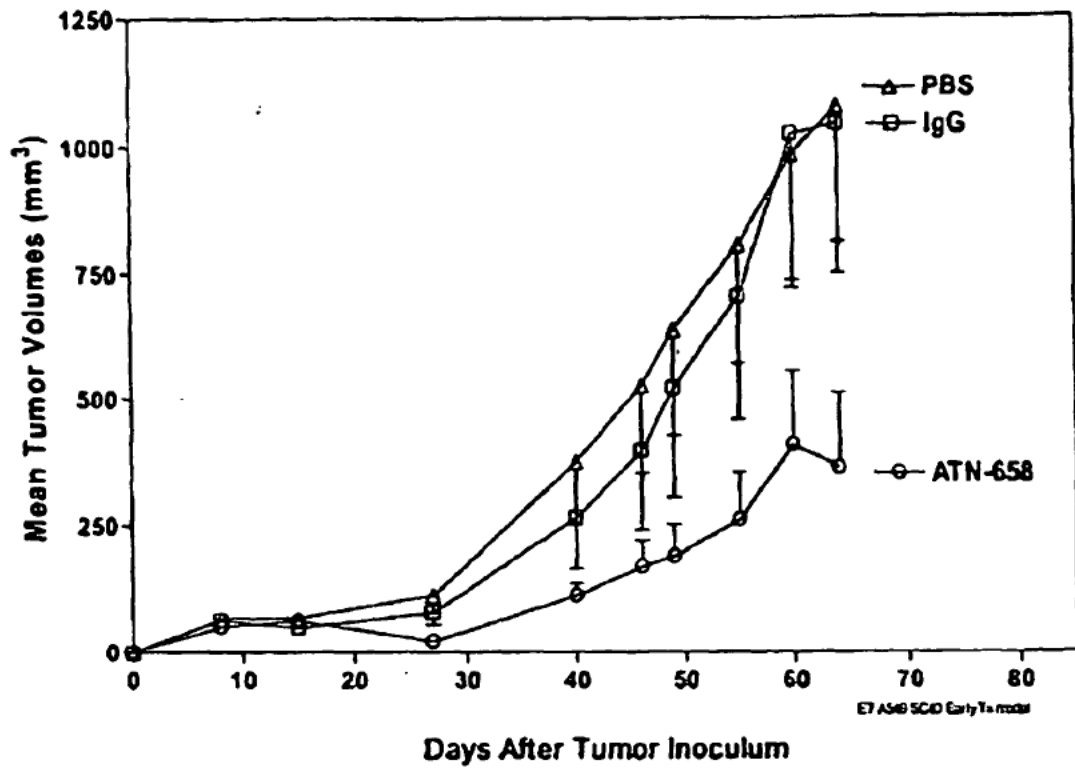


FIG. 4

suPAR Amino Acid #	Human	<i>Cercopithecus aethiops</i> (African Green monkey; COS-1)	<i>Macaca fascicularis</i> (Crab eating or Long tailed Macaque)
125	V	M	V
152	G	G	S
157	N	N	S
192	R	H	H
229	H	Y	Y
242	A	V	V
249	H	R	R
259	N	N	H
262	D	N	N
264	S	F	S
268	K	E	E
278	V	V	V
282	S	K	K

FIG. 5A

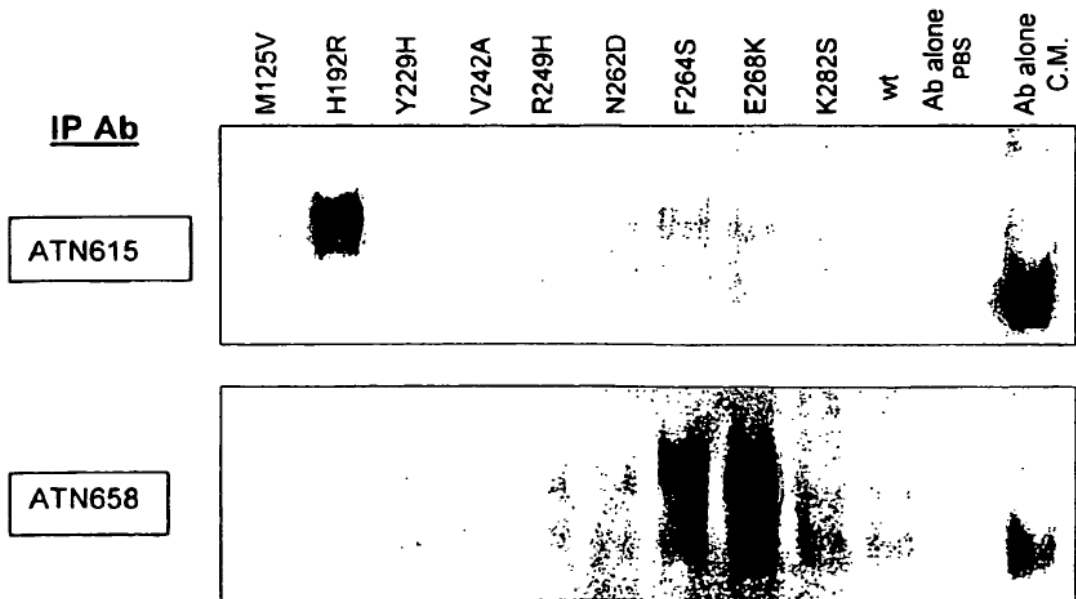


FIG. 5B

265

279

**CCTKSGCNHPDLDV**

<b>Human uPAR Mutation</b>	<b>ATN-658 Binding</b>	<b>ATN-617 Binding</b>
WT	++++	++++
T267A	++++	++++
K268A	+++	++++
S269A	++++	++++
H273A	+	++++
P274A	++++	nd
D275A	++	nd
D277A	+++	nd
V278A	++++	nd
Q279A	++++	nd

FIG. 6



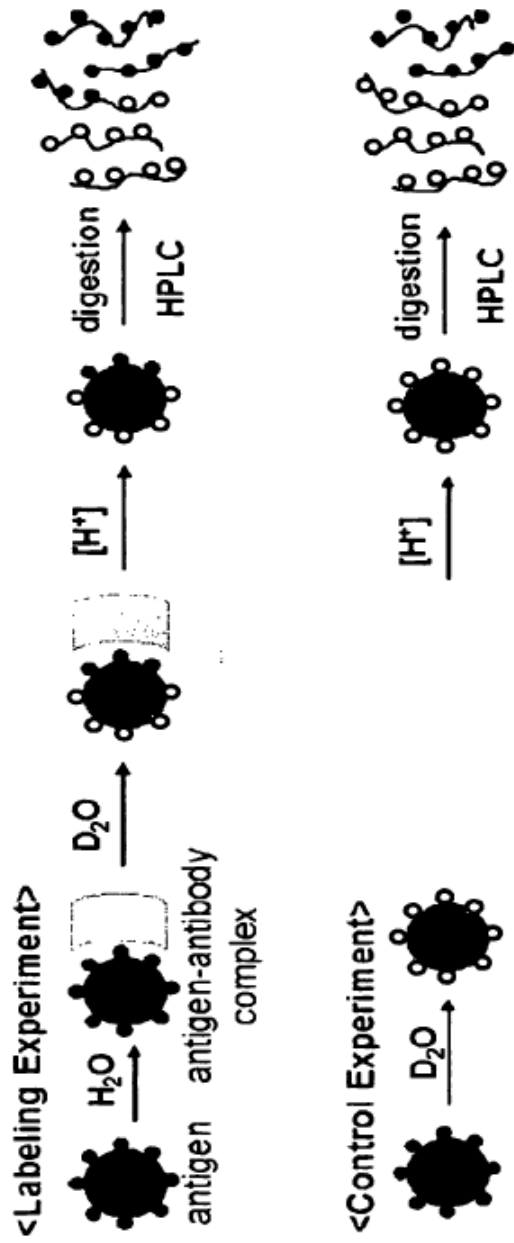


FIG. 7A

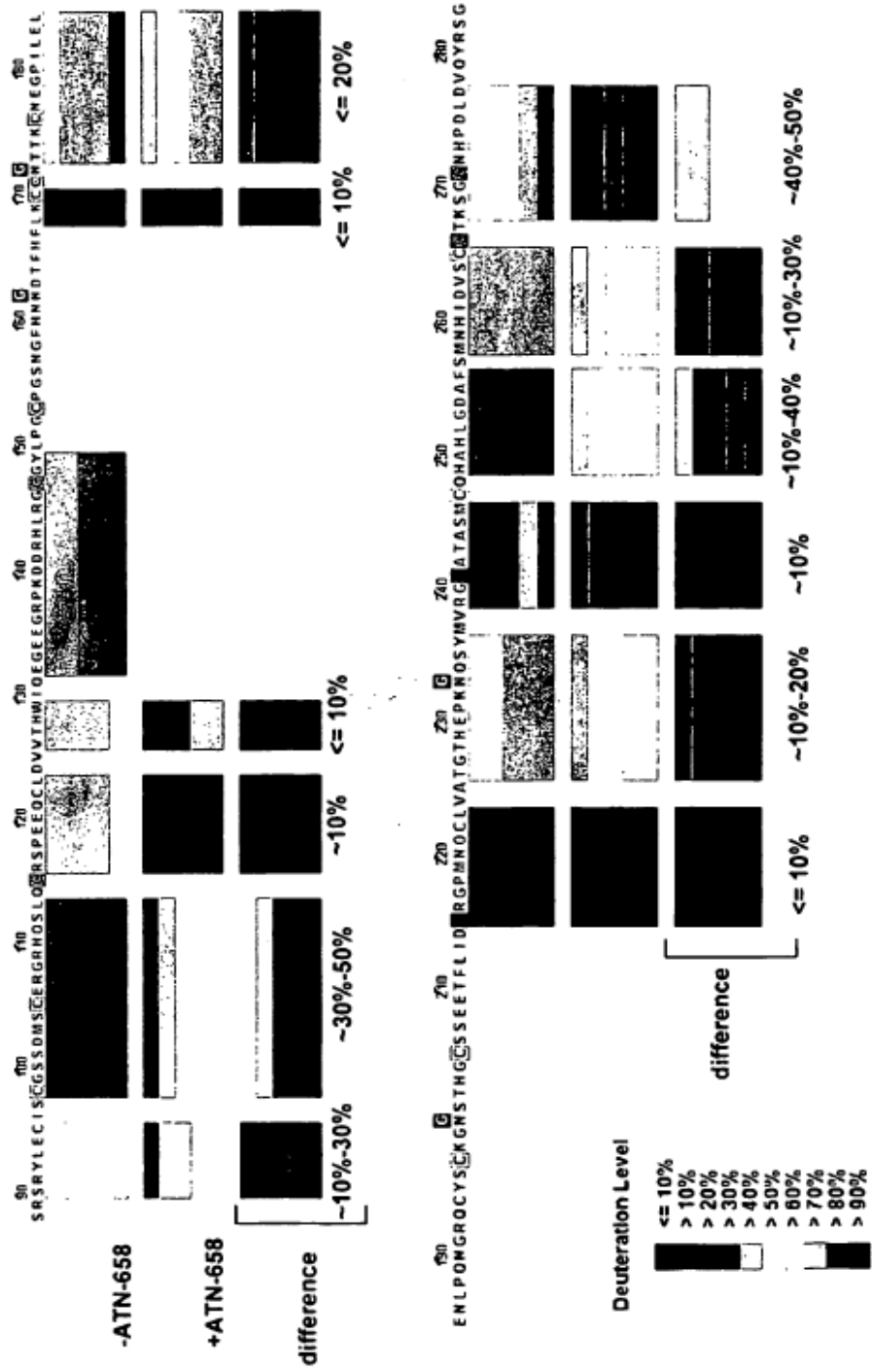


FIG. 7B

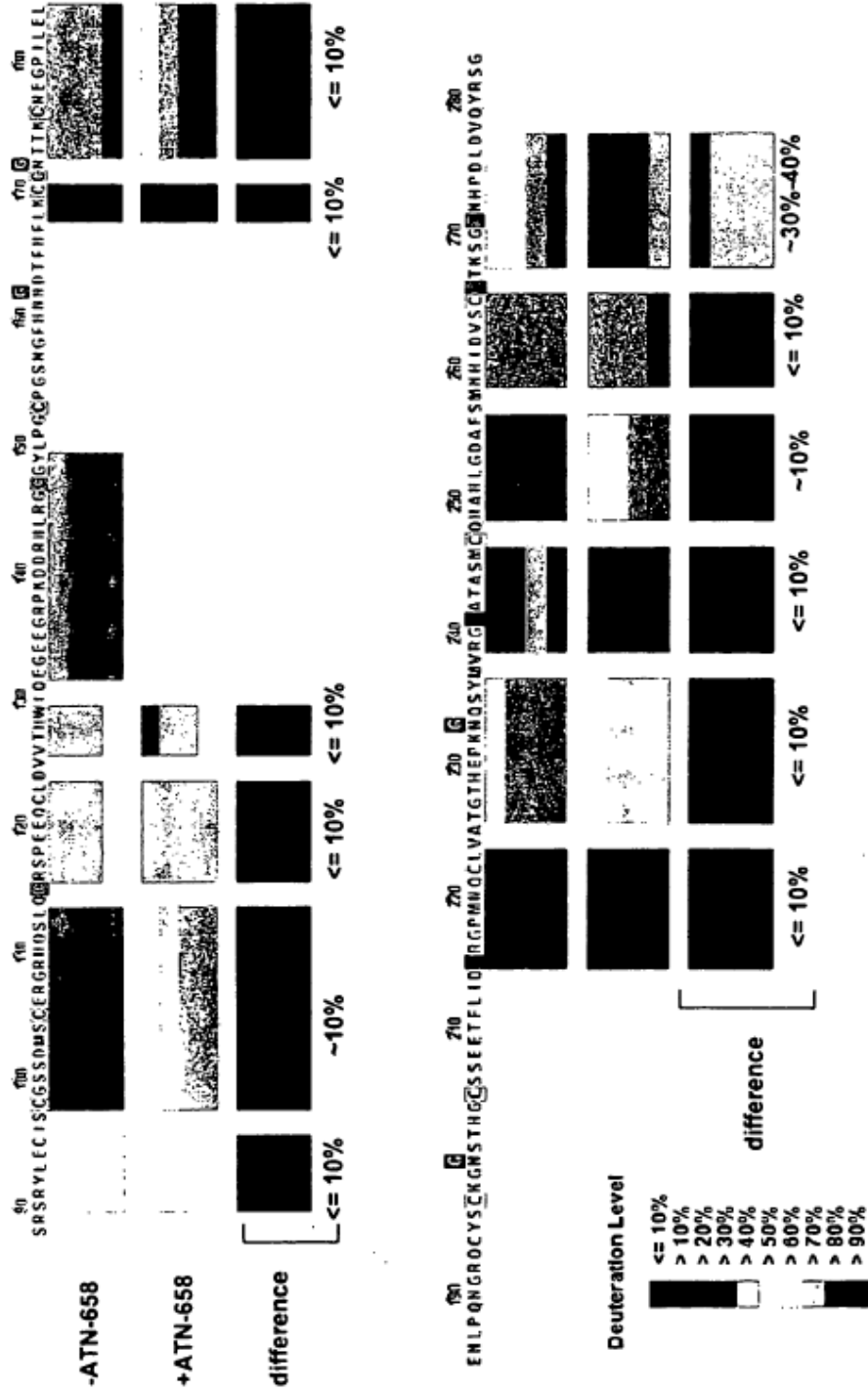


FIG. 7C

Figuras:

	Castellano	Inglés
Fig. 2	Log (Competidor) M	Log (Competitor) M
Fig. 3	% de cambio a partir de la línea de base	% change from baseline
	Tx iniciado d27	Tx started d27
	Días desde inoculación del tumor	Days After Tumor Inoculum
Fig. 4	Volúmenes medios del tumor (mm <sup>3</sup> )	Mean Tumor Volumes (mm <sup>3</sup> )
	Días desde inoculación del tumor	Days After Tumor Inoculum
Fig. 5A	Aminoácido suPAR #	suPAR Amino Acid #
	Humano	Human
	<i>Cercopithecus aethiops</i> Mono verde africano; COS-1	<i>Cercopithecus aethiops</i> African Green monkey; COS-1
	<i>Macaca fascicularis</i> (Macaco de cola larga o comedor de cangrejos)	<i>Macaca fascicularis</i> (Crab eating or Long tailed Macaque)
Fig. 6	Mutación de uPAR humano	Human uPAR Mutation
	Unión ATN-658	ATN-658 Binding
	Unión ATN-617	ATN-617 Binding
Fig. 7A	<Experimento etiquetador>	<Labeling Experiment>
	antígeno	antigen
	complejo antígeno-anticuerpo	antigen-antibody complex
	digestión	digestion
	<Experimento de control>	<Control Experiment>
	digestión	digestion
Fig. 7B	diferencia	difference
	Nivel de deuteración	Deuteration Level
	diferencia	difference
Fig. 7B	diferencia	difference
	Nivel de deuteración	Deuteration Level
	diferencia	difference