

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 278**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/08</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/53</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/10</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)		
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)		
<b>C07K 7/06</b>	(2006.01)		
<b>C07K 7/08</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/705</b>	(2006.01)		
<b>C07K 16/34</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/62</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/85</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2013 PCT/IL2013/050231**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13150518**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013 E 13772448 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2833900**

54 Título: **Péptidos de inductor de metaloproteína de matriz extracelular (emmprin) y anticuerpos de unión**

30 Prioridad:

**01.04.2012 US 201261618790 P**  
**27.12.2012 US 201261746135 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.02.2019**

73 Titular/es:

**TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT  
FOUNDATION LIMITED (50.0%)  
Senate Building  
Technion City, Haifa 3200004 , IL y  
MOR-RESEARCH APPLICATIONS LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RAHAT, MICHAL A.;  
LAHAT, NITZA;  
WALTER, MIRIAM y  
BITTERMAN, HAIM**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 702 278 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

Péptidos de inductor de metaloproteínasa de matriz extracelular (emmprin) y anticuerpos de unión

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] La presente invención se refiere a péptidos de un determinante antigénico específico del inductor de metaloproteínasa de matriz extracelular de proteína (EMMPRIN), a anticuerpos que reconocen específicamente estos péptidos, y al uso de los péptidos y/o anticuerpos en el diagnóstico, prevención e inmunoterapia de enfermedades que implican angiogénesis, incluyendo cáncer, trastornos de la retina y enfermedades inflamatorias.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] El inductor de metaloproteínasa de matriz extracelular (EMMPRIN, también conocido como CD147, basigina, neutrelina, antígeno de grupo sanguíneo OK, antígeno de activación de leucocitos M6 y factor estimulante de colagenasa derivado de células tumorales TCS), es una proteína promotora de tumores expresada por ambos tumores y las células estromales que han demostrado inducir tanto el factor de crecimiento endotelial vascular proangiogénico (VEGF) como la matriz extracelular (MEC) degradan las metaloproteasas de matriz (MMP), incluida la MMP-9. Además, EMMPRIN está involucrado en el metabolismo de los tumores a través de sus interacciones con los transportadores de lactato MCT-1 y MCT-4, en la resistencia a los medicamentos contra los tumores a través de sus interacciones con las ciclofilinas y la proteína MDR<sub>1</sub> (P-gp), y en la quimiotaxis de los leucocitos a través de sus interacciones con la ciclofilina A extracelular. Los ensayos clínicos que utilizaron una amplia gama de inhibidores de las MMP no mostraron la inhibición de la progresión tumoral, probablemente debido a la redundancia de las MMP en los tejidos tumorales, y los anticuerpos anti-VEGF proporcionan solo una inhibición temporal de la progresión tumoral. EMMPRIN, con sus múltiples funciones en la supervivencia y el crecimiento del tumor, puede servir como un objetivo atractivo en la inmunoterapia del cáncer, por lo que la inmunización contra esta única molécula puede afectar simultáneamente muchas de sus funciones para promover la enfermedad.

30 [0003] Tanto las células tumorales como los leucocitos infiltrantes, en particular los macrófagos, secretan altos niveles de factores promotores de tumores, tales como el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares proangiogénicos (VEGF) y las MMP que degradan la ECM, tanto cruciales para la progresión tumoral, invasividad, metástasis y angiogénesis. Los altos niveles de MMP, particularmente MMP-9, liberan y activan el VEGF que queda atrapado por la ECM, y permiten la migración de leucocitos, células tumorales metastásicas y células endoteliales. VEGF es un quimioatrayente para macrófagos y un regulador de MMP-9. Por lo tanto, existe un circuito de retroalimentación positiva por el cual MMP-9 y VEGF se potencian mutuamente (Hollborn et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007; 48: 4360-4367).

40 [0004] La EMMPRIN tiene un papel crítico en la espermatogénesis, la fertilización femenina y el desarrollo de la retina (Weidle et al., 2010; 7: 157-169). En el contexto tumoral, EMMPRIN se expresa tanto en células tumorales como estromales, incluidos macrófagos (Nabeshima et al., Pathol Int. 2006; 56: 359-367., Yan et al., Thromb Haemost. 2005; 93: 199-204), y funciones para mejorar la expresión de VEGF y MMP, incluyendo MMP-9, en tumores sólidos. La sobreexpresión de EMMPRIN aumenta la invasividad de las células tumorales, y el anticuerpo neutralizante contra EMMPRIN reduce el nivel de MMP-9 celular y la expresión de VEGF. Las funciones adicionales de EMMPRIN también son importantes para la supervivencia y la progresión del tumor, como su capacidad para acompañar a los transportadores de monocarboxilatos MCT-1 y MCT-4 que transportan el lactato fuera de las células, su participación en el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR) a través de sus interacciones con ciclofilina A y P-gp (Kanekura T, Chen X. J Dermatol Sci. 2010; 57: 149-154), y su capacidad para reclutar leucocitos en el tumor a través de sus interacciones con ciclofilina A (Yurchenko V et al., Clin Exp Immunol. 2010; 160:305-317). Por lo tanto, apuntar a esta única molécula puede tener muchos efectos beneficiosos en la inmunoterapia del cáncer.

55 [0005] La regulación de la expresión de EMMPRIN es generalmente desconocida, aunque EGFR y la angiotensina II estaban implicadas en la expresión de EMMPRIN en fibroblastos y macrófagos, respectivamente. Igualmente desconocida es la(s) vía(s) de señalización que inicia EMMPRIN para inducir MMP-9 y VEGF, aunque EMMPRIN homófila: unión a EMMPRIN, anclada en superficie o soluble (Belton et al., J Biol Chem. 2008; 283:17805-17814), se demostró que los eleva y promueve el crecimiento tumoral y la angiogénesis (Tang et al. Cancer Res. 2005; 65:3193-3199). La capacidad para elevar MMP-9 se mapeó al primero de los dos dominios extracelulares altamente glicosilados (EC-I, EC-II o DI y D-II, Belton RJ, et al, *ibid*), pero no se conocen los epitopos precisos ni es la región que regula la inducción de VEGF. Además, EMMPRIN tiene una isoforma más larga que tiene un dominio similar a la membrana distal Ig (EC-0 o D-0, Muramatsu T, Expert Opin. Ther. Targets, 2012, 16 (10): 999-1011), que se expresa principalmente en la retina y se presume que funciona en el complejo que transporta el lactato.

65 [0006] Se han hecho varios intentos para apuntar a EMMPRIN. El derribo de EMMPRIN por un pequeño ARN interferente (siARN) disminuyó la MMP-9 y disminuyó la invasividad de una línea celular de cáncer de próstata *in vitro* (Wang et al. Cancer Biol Ther. 2006; 5:608-614). Los anticuerpos monoclonales (mAbs) contra el fragmento extracelular de EMMPRIN redujeron o produjeron MMP-2 en fibroblastos humanos co-cultivados con células de

carcinoma hepatocelular (HCC) *in vitro*, lo que sugiere que diferentes epítomos de EMMPRIN pueden estar involucrados en la inducción de MMP. Otro mAb anti-EMMPRIN redujo las MMP y la secreción de VEGF en el cultivo de la línea celular de cáncer de cabeza y cuello con fibroblastos (Dean et al. Clin Cancer Res. 2009; 15: 4058-4065). Licartin, el fragmento F(ab)<sub>2</sub> de un anticuerpo anti-EMMPRIN, retrasó la recurrencia del hepatoma después del trasplante en pacientes humanos (Xu et al. Hepatology. 2007; 45: 269-276), lo que sugiere la posibilidad de agregar inmunización pasiva con anti-EMMPRIN a los enfoques de inmunoterapia ya existentes (por ejemplo, anti-Her/neu en cáncer de mama). Sin embargo, los anticuerpos anti-EMMPRIN se generaron contra todo el fragmento extracelular, por lo que los epítomos responsables de las diferentes actividades de EMMPRIN permanecen sin identificar. Esto puede ser importante cuando se diseña inmunoterapia anti-EMMPRIN, ya que atacar diferentes epítomos puede tener diferentes efectos sobre la actividad fisiológica o tumoral de la proteína. Existen protocolos experimentales de inmunización activa, como la administración de lisados tumorales completos, péptidos antigénicos tumorales, células dendríticas pulsadas con antígeno o plásmidos de ADN desnudo, pero aún no se ha informado la inmunización activa a EMMPRIN.

## 15 Angio genesis

[0007] La angiogénesis es un evento celular importante en el que las células endoteliales vasculares proliferan, se podan y se reorganizan para formar nuevos vasos a partir de redes vasculares preexistentes. Existe evidencia convincente de que el desarrollo de un suministro vascular es esencial para la inflamación y los procesos proliferativos normales y patológicos. El compartimento vascular es necesario no solo para el desarrollo y la diferenciación de los órganos durante la embriogénesis, sino también para la curación de heridas, la reparación de tejidos y las funciones reproductivas en el adulto.

[0008] La angiogénesis también está implicada en la patogénesis de una variedad de trastornos, que incluyen, entre otros, tumores, retinopatías proliferativas, degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide y psoriasis. La angiogénesis es esencial para el crecimiento de la mayoría de los tumores primarios y su metástasis posterior. Los tumores pueden absorber suficientes nutrientes y oxígeno por difusión simple hasta un tamaño de 1-2 mm, momento en el cual su crecimiento adicional requiere la elaboración de un suministro vascular. Se cree que este proceso implica el reclutamiento de la vasculatura madura del huésped vecino para comenzar a brotar nuevos vasos capilares, que crecen hacia la masa tumoral y, posteriormente, se infiltran en ella. Además, la angiogénesis tumoral implica el reclutamiento de células precursoras endoteliales circulantes de la médula ósea para promover la neovascularización. Se sugiere que el proceso de angiogénesis está regulado por un equilibrio entre las moléculas pro y anti-angiogénicas, y está descarrilado en varias enfermedades, especialmente en el cáncer.

[0009] La angiogénesis (que implica la secreción de factores proangiogénicos como el VEGF) se inicia en muchas enfermedades inflamatorias, especialmente en enfermedades inflamatorias crónicas.

[0010] El VEGF, cuya forma más prevalente es VEGF-A o factor de permeabilidad vascular (VPF), se ha informado como un regulador fundamental de la angiogénesis tanto normal como anormal. El VEGF humano es una glicoproteína dimérica de 32-42 kilodalton (kDa) que media la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad vascular y la proliferación de células endoteliales.

[0011] El ARNm de VEGF está sobreexpresado por la mayoría de los tumores humanos examinados. Dado su papel central en la promoción del crecimiento tumoral, el VEGF es un objetivo muy atractivo para la intervención terapéutica. De hecho, se están desarrollando diversas estrategias terapéuticas destinadas a bloquear el VEGF o su sistema de señalización del receptor para el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

[0012] Las MMP son una familia de endopeptidasas dependientes de cinc degradantes de proteínas altamente homólogas. Esta familia incluye más de 25 miembros que pueden dividirse en collagenasas (MMP-1, -8 y -13), gelatinasas (MMP-2 y -9), estromelisininas (MMP-3 y -10), matrilisininas (MMP-7 y -26), y MMP de tipo membrana (MMP-14 a -17 y -24). Las MMP son importantes en muchos procesos biológicos normales, incluidos el desarrollo embrionario, la ovulación y la implantación, el crecimiento óseo, la angiogénesis, la inflamación y la cicatrización de heridas, así como en procesos patológicos como el cáncer, las enfermedades autoinmunes, la aterosclerosis y las enfermedades isquémicas, la enfermedad de Alzheimer y la destrucción de tejidos. Las MMP dividen colectivamente la mayoría, si no todos, los constituyentes de la ECM y están involucrados en la descomposición y remodelación de muchos tejidos y órganos.

[0013] Todas las enfermedades inflamatorias requieren el movimiento celular a través de la MEC. En particular, los leucocitos deben migrar desde los vasos sanguíneos a través de la membrana basal (BM) y la ECM para llegar al sitio inflamatorio. Esto requiere la degradación o remodelación del ECM y BM, que emplea MMP, incluyendo MMP-9. Además, muchas enfermedades inflamatorias requieren un suministro de sangre nuevo o adicional al sitio inflamatorio, porque la mayor cantidad de células en el infiltrado de leucocitos tiene mayores demandas metabólicas que demandan más oxígeno y nutrientes.

## 65 Estrategias EMMPRIN y anti-EMMPRIN:

[0014] Ku et al (Scandinavian Journal of Immunology 2007, 65, 435-443) describe el mapeo de epítomos de varios mAbs contra EMMPRIN y sugiere que el fragmento que tiene la secuencia AAGTVFTTVEDLGSKILLTCSLNDSATEV desempeña un papel crítico en las funciones de esta proteína en la secreción de MMP y invasión tumoral.

5 [0015] Kawakami et al. (MBC cancer 2011, 11:300, <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/300>) demostró, usando un polipéptido de 61 aminoácidos correspondiente al dominio EC-I de EMMPRIN que este dominio puede imitar la actividad de EMMPRIN en términos de estimular la producción de MMP-2 por los fibroblastos, cuando se sustituye con quitobiosa, el disacárido con el que comienza la N-glicosilación.

10 [0016] La patente de EE.UU. nº 7452680 describe una proteína de fusión entre la secuencia completa de CD147 de roedor y el transportador MCT1 humano.

[0017] La Patente de EE.UU. Nº 7005500 describe una variante polimórfica de basigina humana que contiene dos dominios de inmunoglobulina, uno de los cuales es un dominio de 56 aminoácidos. La nueva variante, llamada BASI2, muestra actividades biológicas similares como basigin, pero muestra parámetros cinéticos mejorados durante las interacciones proteína-proteína.

[0018] Sato et al. (Gynecologic Oncology 2009; 114:337-342) describe péptidos que inhiben la producción estimulada por EMMPRIN de metalo-proteinasas. Dos de los péptidos descritos exhiben, entre otros, que el aminoácido estira G-H-R-WLK y LKG-G-V-VLK, respectivamente.

[0019] Koga et al. (Int. J.of Oncol. 2011; 39:657-664) describe 20-23 péptidos mer, uno de los cuales comprende el tramo de aminoácidos G-H-R-W-L-K-G-G-V-V. Se ha encontrado que los péptidos 20-23 mer inhiben las metalo-proteinasas.

25 [0020] Ninguna de las publicaciones describe el determinante antigénico específico de EMMPRIN descrito en la presente invención, sus péptidos y los anticuerpos específicos que se unen a dicho determinante antigénico. Existe una necesidad no satisfecha de proporcionar péptidos inmunogénicos e inmunoterapéuticos aislados y anticuerpos dirigidos contra ellos que puedan usarse para diagnosticar, prevenir y tratar afecciones médicas tales como enfermedades proliferativas e inflamatorias asociadas con la expresión de la proteína EMMPRIN y con la regulación de los niveles de VEGF y MMP..

## SUMARIO DE LA INVENCION

35 [0021] La presente invención proporciona nuevas secuencias peptídicas cortas, de un epítopo particular de la proteína inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular (EMMPRIN), que puede usarse en prevención e inmunoterapia y como determinantes antigénicos para generar anticuerpos específicos contra EMMPRIN. Estos péptidos y anticuerpos pueden usarse en el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de afecciones médicas asociadas con la expresión de EMMPRIN y la regulación de la expresión de VEGF. Se descubrió inesperadamente que los anticuerpos contra estos determinantes peptídicos son capaces de inhibir VEGF y MMP-9 *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo*. También se encontró inesperadamente que estos nuevos péptidos utilizados para inmunizar ratones inhiben el crecimiento del tumor e incluso causan la regresión de algunos de los tumores e inhiben el desarrollo de un nuevo tumor cuando se vuelven a desafiar con la inyección de células tumorales. También se muestra aquí que la vacunación terapéutica basada en péptidos no solo reduce la progresión del tumor, sino que también regresa y cura los tumores y provoca una memoria inmune que es eficaz para prevenir la remisión del tumor. Aún más inesperadamente, se muestra que dicha vacunación terapéutica produce una reducción del desarrollo metastásico.

50 [0022] La presente invención se basa en el papel central de EMMPRIN en la progresión tumoral y proporciona métodos de inmunización con un determinante antigénico recientemente identificado ubicado en el dominio EC-I de EMMPRIN para la prevención e inmunoterapia de enfermedades proliferativas e inflamatorias, y los métodos de inmunización e inmunoterapia con péptidos de dicho determinante antigénico, que pueden apoyar los tratamientos existentes y prevenir la recurrencia del tumor y el desarrollo de metástasis. EMMPRIN, como se usa en la presente descripción, abarca cualquier variante de mamífero de la proteína. Por ejemplo, la proteína EMMPRIN puede ser de humanos o de una especie de roedor. La secuencia de EMMPRIN se puede establecer en una secuencia seleccionada del grupo que consta de: números de acceso humanos: NM\_001728,2, NM\_198589,1, NM\_198591,1; números de acceso del ratón: NM\_009768,2, NM\_001077184,1; números de acceso de ratas: NM\_012783,3, NM\_001109882,1; números de acceso de Bos Taurus: BC151413,1, BC103059,1, NM\_001075371,1; Equus caballus número de acceso NM\_001098795,1; número de acceso de Sus scrofa: NM\_001123086,1; número de acceso de conejo; NM\_001082374,1; número de acceso de chimpancé (Pan troglodytes): AK304941,1.

[0023] De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un péptido aislado de hasta 25 aminoácidos, que comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 13  
G-H-R-WX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>G-GX<sub>3</sub>V LX<sub>4</sub> (SEQ ID NO.: 13)  
65 en donde X<sub>1</sub> se selecciona de Met y Leu, X<sub>2</sub> se selecciona de Arg y Lys, X<sub>3</sub> se selecciona de Lys y Val y X<sub>4</sub> es Cys o Lys.

**[0024]** De acuerdo con realizaciones particulares, el péptido comprende la secuencia expuesta en: G-H-R-WX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>G-GX<sub>3</sub>VLC (SEQ ID NO.: 12); en donde X<sub>1</sub> se selecciona de Met y Leu, X<sub>2</sub> se selecciona de Arg y Lys, y X<sub>3</sub> se selecciona de Lys y Val.

5 **[0025]** De acuerdo con otras realizaciones particulares, el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

G-H-R-WX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>G-GX<sub>3</sub>VLX<sub>4</sub> (SEQ ID NO.: 13);  
 G-H-R-W-M-R-G-G-K-VLX<sub>4</sub> (SEQ ID NO.: 14); y  
 10 G-H-R-W-L-K-G-G-V-VLX<sub>4</sub> (SEQ ID NO.: 15)

en donde X<sub>1</sub> se selecciona de Met y Leu, X<sub>2</sub> se selecciona de Arg y Lys, X<sub>3</sub> se selecciona de Lys y Val y X<sub>4</sub> es Cys o Lys. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

15 **[0026]** De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona una proteína de fusión que comprende al menos un péptido de la presente invención.

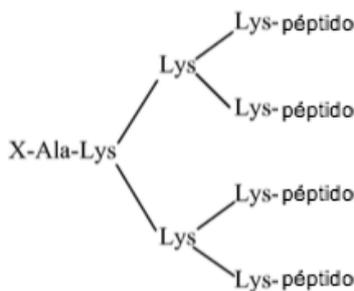
**[0027]** Según algunas realizaciones, se proporciona un multímero peptídico que comprende una pluralidad de péptidos idénticos o diferentes definidos anteriormente.

20 **[0028]** Según algunas realizaciones, se proporciona un multímero peptídico que comprende al menos dos péptidos idénticos o diferentes definidos anteriormente, en donde dichos péptidos o análogos de péptidos están unidos covalentemente.

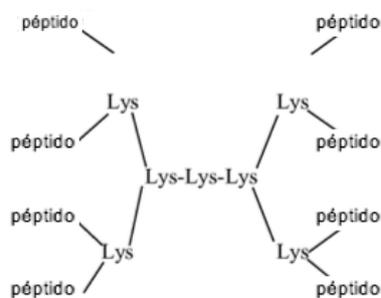
25 **[0029]** De acuerdo con algunas realizaciones, el multímero peptídico comprende un enlazador. De acuerdo con realizaciones particulares, el enlazador comprende 3-12 residuos de lisina. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

**[0030]** Según algunas realizaciones, el multímero peptídico comprende 2-16 péptidos diferentes o idénticos.

30 **[0031]** Según una realización particular, el multímero peptídico es una molécula de acuerdo con la Fórmula II o III:



**Fórmula II**



**Fórmula III**

60 en donde X representa el C-terminal del péptido seleccionado del grupo carboxi-ácido, amida o alcohol, "péptido" denota un tramo de 7-25 aminoácidos que comprende al menos seis aminoácidos contiguos derivados de la Fórmula I: X<sub>5</sub>-G-H-R-W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G-G-X<sub>3</sub>-VL-X<sub>4</sub>, en donde X<sub>1</sub> se selecciona de Met y Leu, X<sub>2</sub> se selecciona de Arg y Lys, X<sub>3</sub> se selecciona de Lys y Val; X<sub>4</sub> es Cys, Lys o representa el C-terminal del péptido seleccionado del grupo carboxi-ácido, amida o alcohol, y X<sub>5</sub> es Cys, Lys o representa el N-terminal del péptido que puede estar acilado. Cada posibilidad  
 65 representa una realización separada de la presente invención.

- 5 **[0032]** El péptido de la presente invención se puede producir mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos recombinantes y sintéticos. De este modo se puede proporcionar un péptido sintético, un multímero de péptido o un conjugado de péptido. También se puede proporcionar un péptido producido de forma recombinante, un multímero peptídico, una proteína de fusión peptídica o un conjugado peptídico con una proteína transportadora.
- [0033]** La proteína de fusión puede comprender un portador inmunogénico, tal como una molécula de inmunoglobulina.
- 10 **[0034]** Las secuencias de polinucleótidos aisladas que comprenden al menos una secuencia que codifica un péptido también se incluyen en el alcance de la presente invención. Una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido puede estar unida a la traducción a otra secuencia de polinucleótidos, como una molécula de ARN o ADN, y se expresa de forma recombinante dentro de las células diana. Alternativamente, dicha secuencia polinucleotídica puede ser parte de un vector viral o bacteriano recombinante.
- 15 **[0035]** De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido, secuencia de polinucleótido, vector, multímero de péptido, anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se define anteriormente, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 20 **[0036]** La composición farmacéutica puede formularse como una vacuna.
- [0037]** La composición de la vacuna puede comprender un adyuvante o un sistema de administración. Alternativamente, la formulación de la vacuna no puede comprender un adyuvante o sistema de entrega. La formulación de vacuna puede comprender al menos un multímero peptídico, proteína de fusión o conjugado peptídico.
- 25 **[0038]** Los adyuvantes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de lípidos y liposomas. El adyuvante se puede seleccionar del grupo que consiste en: Montanide®, alumbre, muramilo dipéptido, Gelvac®, micropartículas de quitina, quitosán, subunidad B de toxina del cólera, toxina lábil, AS<sub>2</sub>1A, Intralipid® y Lipofundin®.
- 30 **[0039]** La vacuna se puede formular para administración intramuscular, intranasal, oral, intraperitoneal, subcutánea, tópica, intradérmica y transdérmica. La vacuna se puede formular para administración intramuscular o para administración intranasal.
- 35 **[0040]** También se describen, pero no forman parte de la presente invención, métodos para inducir una respuesta inmune contra EMMPRIN en un sujeto, que comprenden administrar una composición de vacuna que comprende al menos un péptido sintético o recombinante, un análogo de péptido, un conjugado, un multímero o una proteína de fusión de acuerdo con a la invención.
- 40 **[0041]** Una composición de vacuna, que comprende al menos un péptido sintético o recombinante, un análogo de péptido, un conjugado, un multímero o una proteína de fusión de acuerdo con la invención, se puede usar para inducir una respuesta inmune contra EMMPRIN en un sujeto.
- 45 **[0042]** También se describen métodos y usos de los péptidos, multímeros de péptidos y conjugados de péptidos para la producción de anticuerpos específicos para EMMPRIN. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales. Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.
- 50 **[0043]** De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un anticuerpo para EMMPRIN, o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende al menos una porción de unión a antígeno, en donde dicho anticuerpo reconoce un determinante antigénico que comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO.: 5, 6, 7, u 8 dentro de la secuencia:  
G-H-R-W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G-G-X<sub>3</sub>-V-L) (SEQ ID NO.: 9)
- 55 en donde X<sub>1</sub> se selecciona de Met y Leu, X<sub>2</sub> se selecciona de Arg y Lys, y X<sub>3</sub> se selecciona de Lys y Val. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. Según algunas realizaciones, el anticuerpo reconoce un determinante antigénico que comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 5, 6, 7 u 8 dentro de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 60 G-H-R-W-M-R-G-G-K-V-L-C (SEQ ID NO.: 1);  
G-H-R-W-M-R-G-G-K-V-L (SEQ ID NO.: 10); y  
G-H-R-W-L-K-G-G-V-V-L (SEQ ID NO.: 11)
- 65 **[0044]** De acuerdo con realizaciones específicas, el anticuerpo reconoce un determinante antigénico que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

G-H-R-W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub> (SEQ ID NO.: 3);  
 H-R-W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G (SEQ ID NO.: 4);  
 R-W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G-G (SEQ ID NO.: 5);  
 W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G-G-X<sub>3</sub> (SEQ ID NO.: 6);  
 X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G-G-X<sub>3</sub>-V (SEQ ID NO.: 7);  
 X<sub>2</sub>-G-G-X<sub>3</sub>-V-L (SEQ ID NO.: 8);

en donde X<sub>1</sub> se selecciona de Met y Leu, X<sub>2</sub> se selecciona de Arg y Lys, y X<sub>3</sub> se selecciona de Lys y Val. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

**[0045]** El anticuerpo puede ser un mAb. El mAb puede seleccionarse del grupo que consiste en: anticuerpo humanizado, anticuerpo humano, anticuerpo quimérico y un fragmento de anticuerpo que comprende al menos la porción de unión a antígeno de un anticuerpo. El fragmento de anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en: Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fd', Fv, dAb, región CDR aislada, anticuerpo de cadena simple, "anticuerpos" y "anticuerpos lineales".

**[0046]** Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos biespecíficos.

**[0047]** Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la invención puede estar unido de forma traduccional a otra proteína como parte de una molécula polinucleotídica tal como ARN o ADN. La secuencia polinucleotídica puede ser parte de un vector viral o bacteriano recombinante que comprende dicha molécula de ARN o ADN que codifica dicha secuencia de anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

**[0048]** Según este aspecto, se describe un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo de la invención específico para EMMPRIN, un fragmento de anticuerpo del mismo o un conjugado o proteína de fusión que lo comprende. De acuerdo con una realización específica, el anticuerpo específico para EMMPRIN o el fragmento de anticuerpo del mismo que comprende al menos una porción de unión a antígeno, reconoce un determinante antigénico que comprende un epítope seleccionado del grupo que consiste en:

G-H-R-W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub> (SEQ ID NO.: 3);  
 H-R-W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G (SEQ ID NO.: 4);  
 R-W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G-G (SEQ ID NO.: 5);  
 W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G-G-X<sub>3</sub> (SEQ ID NO.: 6);  
 X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G-G-X<sub>3</sub>-V (SEQ ID NO.: 7);  
 X<sub>2</sub>-G-G-X<sub>3</sub>-V-L (SEQ ID NO.: 8);

en donde X<sub>1</sub> se selecciona de Met y Leu, X<sub>2</sub> se selecciona de Arg y Lys, y X<sub>3</sub> se selecciona de Lys y Val. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

**[0049]** Los vectores que comprenden las secuencias polinucleotídicas anteriores, también están dentro del alcance de la presente invención.

**[0050]** En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso en la prevención, atenuación o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de EMMPRIN. La composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido, un multímero peptídico, proteína de fusión o conjugado, o secuencia codificante de ácido nucleico o vector viral o bacteriano que los comprende, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a dicho péptido o análogo de péptido; y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

**[0051]** Una composición para inmunización pasiva puede comprender al menos un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la invención.

**[0052]** La enfermedad o trastorno asociado con la expresión o activación de EMMPRIN puede ser una enfermedad o proliferación celular, una hipopermeabilidad, una enfermedad inflamatoria o relacionada con la angiogénesis (incluido, entre otros, el síndrome nefrótico y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). La enfermedad o trastorno de la proliferación celular puede seleccionarse del grupo que incluye, entre otros: cáncer, enfermedades de la proliferación celular del ojo (enfermedades oculares) y trastornos de la retina.

**[0053]** Los trastornos retinianos incluyen, por ejemplo, membrana neovascular coroidea (CNVM), retinopatía diabética, edema macular, oclusión vascular, degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) y retinopatía del prematuro (ROP).

**[0054]** La enfermedad o trastorno asociado con la expresión o activación de EMMPRIN puede ser una enfermedad inflamatoria crónica o una enfermedad autoinmune, que incluye, entre otros, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y la psoriasis. La enfermedad puede ser una enfermedad inflamatoria aguda que incluye, entre otros, lesión pulmonar aguda y sepsis. La enfermedad también

puede ser una enfermedad cardíaca (p. ej., insuficiencia cardíaca).

**[0055]** En otro aspecto más, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica de la presente invención para su uso en la prevención, atenuación o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de EMMPRIN.

**[0056]** La enfermedad o trastorno asociado con la expresión de EMMPRIN puede ser proliferativa celular, una hiperpermeabilidad, una enfermedad inflamatoria, regenerativa de tejidos o una enfermedad o trastorno relacionado con la angiogénesis.

**[0057]** La enfermedad o trastorno puede seleccionarse del grupo que consiste en: cáncer, enfermedades proliferativas de las células del ojo (enfermedades oculares), trastornos de la retina y artritis reumatoide.

**[0058]** El cáncer puede ser un cáncer metastásico.

**[0059]** El cáncer puede ser un cáncer sólido.

**[0060]** El cáncer sólido puede seleccionarse del grupo que consiste en: cáncer renal, cáncer de colon.

**[0061]** La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse como un tratamiento independiente o en combinación con un tratamiento con cualquier agente antiangiogénico. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un sujeto que lo necesite como parte de un régimen de tratamiento junto con al menos un agente antiangiogénico. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede administrar junto con el agente antiangiogénico o por separado.

**[0062]** La composición farmacéutica según la presente invención se puede administrar junto con una composición antineoplásica. La composición antineoplásica puede comprender al menos un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico, que podría administrarse por separado o junto con el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, puede comprender cualquier agente conocido en la técnica que muestre actividad anticancerígena, que incluye, entre otros: mitoxantrona, inhibidores de topoisomerasa, veneno de huso vincas: vinblastina, vincristina, vinorelbina (taxol), paclitaxel, docetaxel; agentes alquilantes: mecloretamina, clorambucil, ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida; metotrexato; 6-mercaptopurin; 5-fluorouracil, citarabina, gemcitabina; podofilotoxinas: etopósido, irinotecán, topotecán, dacarbazina; antibióticos: doxorubicina (adriamicina), bleomicina, mitomicina; nitrosoureas: carmustina (BCNU), lomustina, epirubicina, idarubicina, daunorubicina; iones inorgánicos: cisplatino, carboplatino; interferón, asparaginasa; hormonas: tamoxifeno, leuprolida, flutamida y acetato de megestrol. El agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en agentes alquilantes, antimetabolitos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidin, análogos de purina e inhibidores relacionados, alcaloides vinca, epipodopilotoxinas, antibióticos, L-asparaginasa, inhibidor de la topoisomerasa, interferones, complejos de coordinación de platino, urea sustituida con antracendiona, derivados de metil hidrazina, supresor adrenocortical, adenocorticosteroides, progestinas, estrógenos, antiestrógenos, andrógenos, y análogo hormonal liberador de gonodotropin. El agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en 5-fluorouracil (5-FU), leucovorina (LV), irinotecán, oxaliplatino, capecitabina, paclitaxel y doxetaxel. Se pueden usar dos o más agentes quimioterapéuticos en un cóctel para administrarse en combinación con la administración del anticuerpo o fragmento del mismo.

**[0063]** Un cáncer enmendable para el tratamiento incluye, pero no se limita a: carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias malignas linfoides. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de pulmón de células pequeñas), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal (incluido el cáncer gastrointestinal), cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, riñón o cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de células B (incluido el linfoma no Hodgkin (LNF) de bajo grado/folicular); NHL folicular (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difusa de grado intermedio; NHL inmunoblástica de alto grado; NHL linfoblástica de alto grado; NHL de células no escindidas de alto grado; enfermedad voluminosa del NHL; célula del manto I linfoma; linfoma relacionado con el SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (LLA); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y el trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), así como la proliferación vascular anormal asociada con las facomatosis, edema (como el asociado con tumores cerebrales) y el síndrome de Meigs. Preferiblemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de recto, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma no Hodgkin (LNH), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de mama, sarcoma de tejido, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, mesotelioma y mieloma múltiple. Las condiciones cancerosas modificables para el tratamiento incluyen cánceres metastásicos.

**[0064]** También se describe el uso de un anticuerpo específico para EMMPRIN o un fragmento de anticuerpo del mismo, para la fabricación de una composición terapéutica para el tratamiento de una enfermedad o trastorno proliferativo de células, relacionado con la angiogénesis o inflamatorio.

5 **[0065]** De acuerdo con una realización, se proporciona un método para detectar o cuantificar la presencia de EMMPRIN, que comprende las etapas de:

i. incubar una muestra con el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con la presente invención;

10 ii. Detectando el EMMPRIN enlazado usando una sonda detectable.

**[0066]** Según algunas realizaciones, el método comprende además las etapas de:

15 iii. comparar la cantidad de (ii) con una curva estándar obtenida de una muestra de referencia que contiene una cantidad conocida de EMMPRIN; y

iv. calculando la cantidad de EMMPRIN en la muestra de la curva estándar.

**[0067]** La muestra puede ser un fluido corporal.

20 **[0068]** Otros aspectos y realizaciones se describen en las reivindicaciones adjuntas.

**[0069]** Otras realizaciones y el alcance completo de la aplicabilidad de la presente invención se harán evidentes a partir de la descripción detallada dada a continuación.

## 25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

### **[0070]**

30 **Figura 1.** Determinación del título y especificidad de los anticuerpos policlonales en sueros obtenidos de conejos inmunizados. Las placas se recubrieron con los diferentes péptidos conjugados con BSA (tiras marcadas con 1) o con BSA sola (tiras marcadas con 2). Los sueros se diluyeron en serie para el ensayo como se indica.

**Figura 2.** Reconocimiento de EMMPRIN recombinante de ratón por anticuerpos policlonales. EMMPRIN recombinante de ratón (200 ng/carril) se cargó en un SDS-PAGE al 10%, se separó electroforéticamente y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se cortó en tiras y cada tira se probó con suero inmune diluido (1: 1.000) o preimmune (P). Se probó una tira con el anti-ratón EMMPRIN de rata comercial y sirvió como control positivo (PC).

35 **Figuras 3A-3C** Efecto del co-cultivo de células tumorales y macrófagos RAW 246,7 sobre la secreción de EMMPRIN (Figura 3A), MMP-9 (Figura 3B) y VEGF (Figura 3C). Cada una de las líneas celulares tumorales ( $0,5 \times 10^6$  células de RENCA, CT26 o TRAMP-C2) se incubaron solos o en co-cultivo con  $0,5 \times 10^6$  células RAW 264,7 (n = 14) durante 48 h. Los sobrenadantes se recogieron y las concentraciones de MMP-9 secretada y VEGF se determinaron mediante ELISA. La expresión de EMMPRIN superficial se determinó mediante citometría de flujo. \*, p <0,05, \*\*\*, p <0,001 en relación con cada uno de los cultivos individuales. \$, p <0,05 en relación con el cultivo único de TRAMP-C2.

40 **Figuras 4A-4C** Efecto del co-cultivo de células tumorales y macrófagos provocados por TG en la secreción de EMMPRIN (Figura 4A), MMP-9 (Figura 4B) y VEGF (Figura 4C). Cada una de las líneas celulares tumorales ( $0,5 \times 10^6$  células de RENCA, CT26 o TRAMP-C2) se incubó sola o en cocultivo con  $0,5 \times 10^6$  macrófagos provocados por TG (n = 4) durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes y se determinaron las concentraciones de MMP-9 secretada y VEGF mediante ELISA. La expresión de EMMPRIN superficial se determinó mediante citometría de flujo. \*, p <0,05, \*\*\*, p <0,001 en relación con cada uno de los cultivos individuales.

50 **Figuras 5A-5B** Efecto de los sueros inmunes y preinmunes del anticuerpo n° 161 sobre la secreción de MMP-9 y VEGF a partir de co-cultivos. Células tumorales RAW 264,7 y CT26 ( $0,5 \times 10^6$  cada una, n = 6; Figura 5B) o células tumorales TRAMP-C2 ( $0,5 \times 10^6$  cada una, n = 10, Figura 5A) se incubaron en co-cultivo durante 48 h con cinco diluciones en serie consecutivas de suero inmune o preimmune. Las concentraciones de VEGF y MMP-9 en los sobrenadantes se determinaron mediante ELISA. \*, p <0,05, \*\*, p <0,01 en relación al co-cultivo sin adición de sueros.

55 **Figuras 6A-6B** Reactividad cruzada del anticuerpo n° 161 con EMMPRIN humana. Las células U937 de tipo monocítico humanas ( $0,5 \times 10^6$ ) se incubaron conjuntamente con las células  $0,5 \times 10^6$  de la línea celular tumoral A498 del carcinoma de células renales humanas (n = 3) (Figura 6A) o la línea celular tumoral MCF-7 del carcinoma de mama (n = 3) (Figura 6B) en un medio sin suero durante 48 horas con diluciones seleccionadas de suero inmune o preimmune. Las concentraciones de VEGF y MMP-9 se determinaron en los sobrenadantes mediante ELISA. \*, p <0,05, \*\*, p <0,01, \*\*\*, p <0,001 en relación al co-cultivo sin adición de sueros.

60 **Figuras 7A-7B** Efecto de la inmunización pasiva con anti-EMMPRIN (n° 161) sobre la tasa de crecimiento del tumor en ratones portadores de tumores RENCA (Figura 7A) y CT26 (Figura 7B). Se inyectaron  $2 \times 10^6$  células tumorales por vía subcutánea (sc) a ratones Balb/C. Una vez que los tumores se hicieron palpables (en el día 13 o 15 para los tumores RENCA y CT26, respectivamente), los ratones se asignaron aleatoriamente a los diferentes grupos y se inyectaron por vía intraperitoneal (ip) con diferentes concentraciones del anticuerpo n° 161

(día 0), seguido mediante dos inyecciones de refuerzo adicionales cada 7 días (flechas negras). \*,  $p < 0,05$ , los grupos de solución salina de control y Ab 162 en relación con el grupo que recibió Ab 161 (25 mg) en los puntos de tiempo indicados.

**Figuras 8A y 8B** Efecto de la inmunización activa con el péptido nº 161 ramificado (161-MAP) sobre el tamaño del tumor en ratones portadores de tumores RENCA (Figura 8A) y CT26 (Figura 8B). Los tumores se generaron en ratones Balb/C como antes, y se asignaron al azar a los diferentes grupos. Después de 7 días, los ratones recibieron la primera inyección del adyuvante solo, el péptido revuelto (péptido antigénico múltiple con la misma composición de aminoácidos en un orden aleatorio) controló el péptido (también en formato de péptido antigénico múltiple (MAP)) o péptido ramificado de formato 161 MAP en diferentes concentraciones disuelto en adyuvante completo de Freund (CFA) directamente en la almohadilla del pie, seguido de dos inyecciones de refuerzo adicionales, donde el péptido se disolvió en adyuvante incompleto de Freund (IFA) cada 7 días (flechas negras). En los tumores RENCA - \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$ , el grupo revuelto en relación con los grupos de 25 mg y 50 mg; En los tumores CT26 - \*,  $p < 0,05$ , \*\*\*,  $p < 0,001$  grupo aleatorizado en relación con todos los otros grupos en los puntos de tiempo indicados; \$\$,  $p < 0,01$  el grupo adyuvante en relación con todos los otros grupos en los puntos de tiempo indicados.

**Figura 9:** El tamaño del tumor CT26 en el día 26 después de 161-MAP o inyecciones de adyuvante como se describe en la Figura 8,

**Figura 10** Las inyecciones de 161-MAP elevan la memoria inmunológica. Los ratones que tenían tumores totalmente regresivos después del tratamiento con MAP (como se describe en la Figura 8) se volvieron a estimular con una inyección sc adicional de  $2 \times 10^6$  células CT26 3 semanas después de la conclusión del experimento anterior. El grupo adyuvante recibió tres inyecciones de refuerzo de CFA e IFA en su almohadilla cada 7 días antes de recibir la inyección de células tumorales CT26. \*\*\*,  $p < 0,001$  en relación con todos los ratones tratados con MAP.

**Figuras 11A y 11B:** 161-MAP elevan la memoria inmunológica que evita las metástasis. Los ratones que se sometieron a un nuevo tratamiento con células CT26 inyectadas en sus flancos y que no desarrollaron ningún tumor (10 meses de edad) se inyectaron iv en su vena de la cola con  $10^6$  células CT26 en 200  $\mu$ L de PBS. Como grupos de control, a ratones jóvenes (8 semanas de edad) o ratones viejos (10 meses de edad) se les inyectaron tres inyecciones de refuerzo de 50  $\mu$ g del MAP revuelto en 30  $\mu$ L de CFA y luego IFA en su almohadilla cada 7 días, y después de una 7 días adicionales se inyectaron con  $10^6$  células CT26 en 200  $\mu$ L de PBS en su vena de la cola. Después de 15 días los ratones fueron sacrificados. Figura 11A) Se extrajeron los pulmones y se contó el número de metástasis con un microscopio de disección. Figura 11B) Los pulmones se secaron en un papel secante y se pesaron.

**Figuras 12A-F:** el 161-MAP evita la formación de metástasis. A los ratones se les inyectaron tres inyecciones de refuerzo de 50 mg del MAP revuelto (control) o de cantidades aumentadas de 161-MAP en 30  $\mu$ L de CFA y luego de IFA en su almohadilla cada 7 días, y después de 7 días adicionales recibieron  $10^6$  células CT26 en 200  $\mu$ L de PBS inyectadas en su vena de la cola. Después de 15 días (para ratones inyectados con CT26) o 23 días (para ratones inyectados con RENCA), los ratones se sometieron a eutanasia y se extrajeron sus pulmones, se pesaron y el número de metástasis se contó bajo un microscopio de disección. Figura 12A) una imagen representativa de los pulmones de ratones inyectados con células CT26 y recibiendo 50  $\mu$ g del MAP revuelto o 75  $\mu$ g de 161-MAP; Figura 12B) el número de focos metastásicos en ratones inyectados con células CT26; Figura 12C) El peso pulmonar de ratones inyectados con células CT26. Figura 12D) Una imagen representativa de los pulmones de ratones inyectados con células RENCA y que reciben 50  $\mu$ g del MAP revuelto o 50  $\mu$ g de 161-MAP; Figura 12E) El número de focos metastásicos en ratones inyectados con células RENCA; Figura 12F) El peso pulmonar de ratones inyectados con células RENCA.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

**[0071]** La presente invención proporciona péptidos EMMPRIN y anticuerpos de unión a EMMPRIN que reducen los niveles de MMP-9 y VEGF *in vitro* e inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*. Los resultados apoyan el importante papel de EMMPRIN en la mediación de las interacciones de células tumorales y macrófagos que dan forma al microentorno del tumor y conducen a un aumento de la angiogénesis y metástasis a través de la secreción de MMP-9 y VEGF. Además, los resultados sugieren que tanto el anticuerpo como el péptido ramificado utilizados para ejemplificar la invención podrían usarse para estrategias de inmunoterapia diseñadas para inhibir el crecimiento tumoral. La inmunización con el péptido EMMPRIN da como resultado la regresión total del tumor y la propagación de la metástasis, y la generación de memoria inmunológica se puede usar en la conjugación con cirugía, radio o quimioterapia para prevenir la recurrencia del tumor.

**[0072]** La vacunación basada en el péptido EMMPRIN demostrada en el presente documento se puede considerar como una vacunación terapéutica, ya que reduce tanto la progresión tumoral como también los tumores regresivos y curados. La vacunación también evocó una memoria inmune persistente que fue eficaz en la prevención de la remisión del tumor hasta 11 meses después de la administración de la inmunización inicial. Se ha producido un anticuerpo policlonal de conejo anti-ratón ejemplar dirigido contra un determinante antigénico específico ubicado en la región del dominio extracelular (EC-I o D-I) de EMMPRIN para demostrar que:

(a) EMMPRIN está regulado al alza en los co-cultivos de células macrófagos-tumores *in vitro*, lo que lleva a un aumento de MMP-9 y VEGF;

(b) El anticuerpo policlonal anti-EMMPRIN inhibe VEGF y MMP-9 *in vitro* e inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* cuando se administra a ratones con tumores palpables;

(c) El mismo péptido usado para la inmunización, sintetizado como un péptido multi-antigénico ramificado (MAP), estimula una respuesta inmune que inhibe el crecimiento del tumor cuando se administra a la almohadilla de ratones con tumores, e incluso causa la regresión de algunos de los tumores;

(d) La respuesta de inmunización activa al constructo peptídico MAP desencadena la memoria inmunológica, ya que los ratones con tumores regresivos no desarrollan nuevos tumores cuando se vuelven a desafiar con la inyección de células tumorales.

**[0073]** Dado que la capacidad de inducir VEGF aún no estaba asociada con ningún dominio o secuencia de EMMPRIN, y dado que el dominio EC-I y la extensión de su glicosilación de EMMPRIN se asociaron con la inducción de MMP-9 (Ku et al., *Ibid*), estos dominios fueron seleccionados para el mapeo de epítomos usando anticuerpos. Los anticuerpos se generaron contra el dominio distal (EC-0, anticuerpos nº 156-160), que es único para la isoforma EMMPRIN larga, para el dominio EC-I (anticuerpos nº 161 y nº 163), y para el dominio EC-II (anticuerpo nº 162). La incapacidad de todos los anticuerpos, excepto el anticuerpo nº 161, de inhibir la secreción, ya sea MMP-9 o VEGF, descarta la participación de estos epítomos en la inducción de estas dos proteínas mediadoras. Solo el anticuerpo nº 161 inhibió la secreción tanto de MMP-9 como de VEGF en los cultivos de TRAMP-C2 y CT26 con 264,7 macrófagos RAW.

**[0074]** Además, el mismo anticuerpo nº 161 inhibió la secreción de MMP-9 y VEGF en los co-cultivos de macrófagos de células tumorales humanas *in vitro*, lo que sugiere que el anticuerpo puede reaccionar de forma cruzada con el epítomo humano de EMMPRIN, aunque la secuencia corta no es totalmente homóloga a la especie humana y se diferencia en 3 aminoácidos. Un estudio reciente (Ku et al., *Ibid.*) mostró que un tramo de 28 aminoácidos (residuos 22-50 de la isoforma corta) fue responsable de la producción de MMP y la invasividad de las células COS-7 transfectadas con EMMPRIN. Sin embargo, el anticuerpo nº 161 se genera contra un corto epítome de 11 aminoácidos en el dominio EC-I justo debajo de la secuencia mencionada, y solo siete aminoácidos aguas abajo del sitio de glicosilación unido a N que se considera crucial para la actividad estimulante MMP. Además, la importancia de la glicosilación se demostró recientemente por la capacidad del péptido EC-I sintetizado conjugado con una unidad de quitobiosa que inicia la glicosilación N, pero no el péptido EC-I solo, para estimular la producción de MMP-2 en fibroblastos (Kawakami et al. *ibid*). Los péptidos EMMPRIN sintéticos con sustitución de quitobiosa estimulan la producción de MMP-2 por los fibroblastos. La secuencia del péptido nº 161 se identificó, por lo tanto, como el determinante antigénico y epítomo responsable de la inducción de VEGF y MMP-9. Sin desear estar ligado a ninguna teoría o mecanismo de acción, se propone que la unión del anticuerpo nº 161 confiere una interferencia estérica con el residuo de asparagina glicosilado ubicado a 7 aminoácidos aguas arriba de este epítome y que la capacidad del anticuerpo nº 161 para inhibir tanto la inducción de MMP-9 como VEGF puede reflejar la unión de EMMPRIN a un único receptor que es responsable de iniciar una vía de señalización que culmina en la inducción de ambas proteínas.

**[0075]** En conclusión, los resultados identifican a EMMPRIN como una molécula clave que es crucial para la progresión del tumor y para la interacción de las células tumorales con las células del estroma, particularmente los macrófagos. Se muestra que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención inhibió la secreción de MMP-9 y VEGF *in vitro*, y que la inyección del anticuerpo o el péptido ramificado inhibió la progresión tumoral *in vivo*.

#### Enfermedades inflamatorias

**[0076]** Todas las enfermedades inflamatorias requieren el movimiento celular a través de la MEC. En particular, los leucocitos deben migrar desde los vasos sanguíneos a través de la membrana basal (BM) y la MEC para llegar al sitio inflamatorio. Esto requiere la degradación o remodelación del ECM y BM, que involucra MMP, incluyendo MMP-9. Además, muchas enfermedades inflamatorias requieren un suministro de sangre nuevo o adicional al sitio inflamatorio, debido a que el mayor número de células en el infiltrado de leucocitos tiene mayores demandas metabólicas que requieren más oxígeno y nutrientes. Por lo tanto, la angiogénesis (que es un proceso que implica la secreción de factores proangiogénicos como el VEGF) se inicia en muchas enfermedades inflamatorias, especialmente en enfermedades inflamatorias crónicas.

**[0077]** Los péptidos de EMMPRIN y los anticuerpos de unión de acuerdo con la invención se describen para su uso en el diagnóstico, la inmunoterapia y la vacunación de enfermedades inflamatorias, especialmente aquellas en las que se detectaron niveles elevados de EMMPRIN, MMP o VEGF. Por ejemplo, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, enfermedad de Crohn); enfermedades cancerosas (p. ej., mama, colon, próstata, gástrica, etc.); enfermedades del corazón (por ejemplo, insuficiencia cardíaca); enfermedades inflamatorias agudas (p. ej., lesión pulmonar aguda, sepsis).

#### Definiciones

**[0078]** Los "derivados" de los péptidos de la invención, como se usan en este documento, cubren los derivados que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que se producen como cadenas laterales en los residuos o los grupos N o C-terminales, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención siempre que sigan

siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad del péptido, no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que lo contienen y no afecten adversamente a sus propiedades inmunogénicas.

5 **[0079]** Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, ésteres alifáticos de los grupos carboxil, amidas de los grupos carboxil producidos por reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acil de grupos amino libres de los residuos de aminoácidos formados por reacción con restos acil (por ejemplo, grupos alcanóilo o aroílo carbocíclico), o derivados O-acil del grupo hidroxilo libre (por ejemplo, el de los restos de seril o treonil) formados por reacción con restos de acil.

10 **[0080]** El término "análogo" indica además una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la invención, excepto por uno o más cambios de aminoácidos. Los análogos según la presente invención pueden comprender también peptidomiméticos. "Peptidomimético" significa que un péptido de acuerdo con la invención se modifica de tal manera que incluye al menos un residuo no codificado o un enlace no peptídico. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, alquilación y una metilación más específica de uno o más residuos, inserción o reemplazo de aminoácidos naturales por aminoácidos no naturales, reemplazo de un enlace amida con otro enlace covalente. Un peptidomimético de acuerdo con la presente invención puede comprender opcionalmente al menos un enlace que es un enlace de reemplazo de amida tal como enlace de urea, enlace de carbamato, enlace de sulfonamida, enlace de hidrazina o cualquier otro enlace covalente. El diseño de "análogos" apropiados puede ser asistido por computadora. Los análogos se incluyen en la invención siempre que sigan siendo farmacéuticamente aceptables.

20 **[0081]** La referencia a un péptido particular o "análogo" incluye la secuencia peptídica que se produce naturalmente o un péptido que tiene sustancialmente la misma actividad que la secuencia que ocurre naturalmente. Los "péptidos" de la invención también incluyen péptidos modificados (con sustituciones de aminoácidos, tanto conservativos como no conservadores, como se describe a continuación) que tienen la misma actividad o mejor que un péptido de tipo salvaje o no modificado. Las "sales" de los péptidos de la invención contemplados por la invención son sales orgánicas e inorgánicas fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables.

30 **[0082]** Los aminoácidos usados en esta invención son aquellos que están disponibles comercialmente o están disponibles por métodos sintéticos de rutina. Ciertos residuos pueden requerir métodos especiales para la incorporación en el péptido, y los enfoques sintéticos secuenciales, divergentes o convergentes de la secuencia del péptido son útiles en esta invención. Los aminoácidos codificados naturales y sus derivados están representados por códigos de tres letras según las convenciones de la IUPAC. Cuando no hay indicación, se utilizó el isómero L. Los isómeros D se indican con "D" antes de la abreviatura del residuo.

35 **[0083]** Las sustituciones conservativas de aminoácidos tal como son conocidas por los expertos en la técnica están dentro del alcance de la presente invención. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen el reemplazo de un aminoácido por otro que tiene el mismo tipo de grupo funcional o cadena lateral, por ejemplo, alifático, aromático, cargado positivamente, cargado negativamente. Estas sustituciones pueden mejorar la biodisponibilidad oral, la penetración en los islotes, la orientación a poblaciones específicas de células beta, la inmunogenicidad y similares. Un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de péptidos, polipéptidos o proteínas que altera, agrega o elimina un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada conservativamente" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica.

**[0084]** Los siguientes seis grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 50 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);  
2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);  
3) Asparagina (N), Glutamina (Q);  
4) Arginina (R), Lisina (K);  
5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y  
6) fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

55 **[0085]** El péptido de la presente invención se puede producir mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos recombinantes y sintéticos. Los métodos sintéticos incluyen síntesis exclusiva en fase sólida, síntesis parcial en fase sólida, condensación de fragmentos o síntesis de solución clásica. Los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, Solid Phase Polypeptide Syntheses (2ª ed., Pierce Chemical Company, 1984). Los péptidos sintéticos se pueden purificar por cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman y Co. NY) y la secuencia peptídica se confirma a través de la secuenciación de aminoácidos mediante métodos conocidos por un experto en la técnica.

65 **[0086]** También, se pueden usar técnicas de proteínas recombinantes para generar el péptido de la presente invención. Por ejemplo, las técnicas de proteínas recombinantes se pueden usar para la generación de polipéptidos

relativamente largos (típicamente más largos que 18 aminoácidos) o secuencias de ácido nucleico o vectores virales o bacterianos para la formulación de vacunas. Las técnicas recombinantes se describen, por ejemplo, por Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153: 516-544, Studier et al. (1990) *Métodos en enzimol.* 185: 60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6: 307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 y Brogli et al., (1984) *Science* 224:838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 559-565 y Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, páginas 421-463.

**[0087]** Un "antígeno" es una molécula o una porción de una molécula capaz de provocar la formación de anticuerpos y estar unida por un anticuerpo. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo. La reacción específica mencionada anteriormente pretende indicar que el antígeno reaccionará, de manera altamente específica, con su correspondiente anticuerpo y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser evocados por otros antígenos. Un antígeno según la presente invención es una forma agonística de VEGF o un fragmento del mismo.

**[0088]** El término "determinante antigénico" o "epítipo" de acuerdo con la invención se refiere a la región de una molécula de antígeno que reacciona específicamente con un anticuerpo particular.

**[0089]** El término "vector viral" o "vector bacteriano" se refiere a un virus o bacteria, respectivamente, que se puede administrar a un huésped humano sin causar ninguna enfermedad o patología y que codifica una proteína o péptido o epítipo no presente en el virus nativo de las bacterias. Dichos vectores virales y bacterianos pueden producirse fácilmente mediante métodos recombinantes bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes incluyen poxvirus, adenovirus, alfavirus, lentivirus, *Listeria monocitogenos*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sonnei*, *Mycobacterium bovis* y *Bacillus anthracis*.

**[0090]** El término "ácido nucleico" en el contexto de la vacuna se refiere a la inyección de ADN en el huésped, por lo que el ADN es captado por las células, transcrito y traducido a proteína o péptido que se presenta al sistema inmunitario y, por lo tanto, provoca respuestas inmunes basadas en anticuerpos y células específicas del péptido de interés. Los ejemplos no limitantes de tales vacunas de ácido nucleico son ácido nucleico purificado administrado solo, complejos de ADN-liposoma, polímeros recubiertos de ADN y ADN recubierto de metal.

**[0091]** Los anticuerpos, o inmunoglobulinas, comprenden dos cadenas pesadas (H) unidas entre sí por enlaces disulfuro y dos cadenas ligeras (L), cada una de las cadenas L está unida a una cadena H respectiva por enlaces disulfuro en una configuración en forma de "Y". La digestión proteolítica de un anticuerpo produce los dominios Fv (Fragmento variable) y Fc (fragmento cristalino). Los dominios de unión al antígeno, los Fab, incluyen regiones donde varía la secuencia polipeptídica. El término  $F(ab')_2$  representa dos brazos Fab' unidos entre sí por enlaces de disulfuro. El eje central del anticuerpo se denomina fragmento Fc. Cada cadena H tiene en su extremo N-terminal un dominio variable (V) ( $V_H$ ) seguido de un número de dominios constantes (C) ( $C_H$ ). Cada cadena L tiene un dominio V ( $V_L$ ) en un extremo y un dominio C ( $C_L$ ) en su otro extremo, el dominio  $V_L$  está alineado con el dominio  $V_H$  y el dominio  $C_L$  está alineado con el primer dominio  $C_H$  ( $C_{H1}$ ). Los dominios V de cada par de cadenas L y H forman el sitio de unión al antígeno. Los dominios en las cadenas L y H tienen la misma estructura general, y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR), cuyas secuencias están relativamente conservadas, unidas por tres dominios hipervariables conocidos como regiones determinantes de complementariedad (CDR1-3). Estos dominios contribuyen a la especificidad y afinidad del sitio de unión al antígeno. El isotipo de la cadena H (gamma- $\gamma$ , alfa- $\alpha$ , delta- $\delta$ , epsilon- $\epsilon$  o mu- $\mu$ ) determina la clase de inmunoglobulina (IgG, IgA, IgD, IgE o IgM, respectivamente). Hay varios subtipos de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). La cadena L es cualquiera de los dos isotipos (kappa,  $\kappa$  o lambda,  $\lambda$ ) que se encuentran en todas las clases de anticuerpos.

**[0092]** El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye mAbs (incluidos mAbs de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, por lo que siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada.

**[0093]** El anticuerpo de acuerdo con la presente invención es una molécula que comprende al menos la porción de unión a antígeno de un anticuerpo. Los anticuerpos o anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos intactos, tales como anticuerpos policlonales o mAbs, así como fragmentos proteolíticos de los mismos, tales como fragmentos Fab o  $F(ab')_2$ . Incluidos además dentro del alcance de la invención están los anticuerpos quiméricos; anticuerpos humanos y humanizados; anticuerpos recombinantes y de ingeniería, anticuerpos biespecíficos y fragmentos de los mismos. Además, el ADN que codifica la región V del anticuerpo se puede insertar en el ADN que codifica las regiones C de otros anticuerpos para producir anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos de cadena única también caen dentro del alcance de la presente invención.

**[0094]** Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solo una parte de un anticuerpo intacto, que generalmente incluye un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, por lo tanto, conserva la capacidad de unirse al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo abarcados por la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene dominios  $V_L$ ,  $C_L$ ,  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio  $C_{H1}$ ; (iii) el fragmento Fd que tiene dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (iv) el fragmento Fd' que tiene dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$  y uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio  $C_{H1}$ ; (v) el

fragmento Fv que tiene los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un solo brazo de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward et al., Nature 1989, 341, 544-546) que consiste en un dominio V<sub>H</sub>; (vii) regiones aisladas de CDR; (viii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, Fv de cadena simple; scFv) (Bird et al., Science 1988, 242, 423-426; y Huston et al., PNAS (USA) 1988, 85,5879-5883); (x) "diacuerpos" con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio V<sub>H</sub> conectado a un dominio V<sub>L</sub> en la misma cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1993, 90, 6444-6448); (xi) "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1) que, junto con los polipéptidos de cadena L complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata et al. Protein Eng., 1995, 8, 1057-1062, y Patente de EE.UU. N° 5, 641,870).

**[0095]** Los anticuerpos de cadena única pueden ser polipéptidos compuestos de cadena única que tienen capacidades de unión a antígeno y que comprenden secuencias de aminoácidos homólogas o análogas a V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, es decir, V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> enlazadas o Fv de cadena única (scFv).

**[0096]** Un "anticuerpo neutralizante" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno a un receptor específico o objetivo de ligando capaz de reducir o inhibir (bloquear) la actividad o señalización a través de un receptor, según lo determinado *in vivo* o en ensayos *in vitro*, según especificación.

**[0097]** El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los MAb son altamente específicos y se dirigen contra un solo antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos), cada mAb se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse en el sentido de requerir la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Los mAb pueden obtenerse por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los mAb que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature 1975, 256, 495, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, N° de patente de EE.UU. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature 1991, 352, 624-628 o Marks et al., J. Mol. Biol., 1991, 222: 581-597, por ejemplo. Los mAb pueden aislarse de una biblioteca de linfocitos humanos y seleccionarse de acuerdo con su especificidad.

**[0098]** Los mAb de la presente invención pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, y cualquier subclase de los mismos. Un hibridoma que produce un mAb puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. Se pueden obtener altos títulos de mAbs por producción en células de mamíferos recombinantes que contienen los ácidos nucleicos que codifican las cadenas H y L del mAb bajo el control de un promotor específico de la célula. Dichas células expresadoras recombinantes se cultivan en grandes volúmenes en biorreactores. Los mAb de cualquier isotipo se purifican a partir de sobrenadantes de cultivo, utilizando métodos de filtración y cromatografía en columna bien conocidos por los expertos en la técnica.

**[0099]** Los mAbs en este documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena H y/o L es idéntica o homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (EE.UU.) Patente N° 4.816.567 y Morrison y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81:6851-6855 (1984)). Además, el injerto de CDR se puede realizar para alterar ciertas propiedades de la molécula de anticuerpo, incluida la afinidad o especificidad. Un ejemplo no limitativo de injertos de CDR se describe en la patente de EE.UU. 5.225.539.

**[0100]** Los anticuerpos quiméricos son moléculas, cuyas diferentes porciones derivan de diferentes especies animales, como las que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región C humana. Los anticuerpos que tienen residuos de FR de la región V sustancialmente del anticuerpo humano (denominado anticuerpo aceptor) y las CDR sustancialmente del anticuerpo de ratón (denominado anticuerpo donante) también se denominan anticuerpos humanizados. Los anticuerpos quiméricos se usan principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para aumentar los rendimientos en la producción, por ejemplo, cuando los mAb murinos tienen mayor inmunogenicidad en humanos (HAMA, que es una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón), de modo que se usan mAbs quiméricos humanos/murinos. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (por ejemplo, las solicitudes de patente PCT WO 86/01533, WO 97/02671, WO 90/07861, WO 92/22653 y las patentes de EE.UU. 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089, 5.530.101 y 5.225.539).

**[0101]** Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos

humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en donde los residuos de las CDR del receptor se reemplazan por los residuos de las CDR de una especie no humana (anticuerpo del donante) como el ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo, la especificidad, la afinidad y la inmunogenicidad reducida. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios V, en los que todos o sustancialmente todos los bucles de CDR corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región C de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana para proporcionar un mAb completo y funciones efectoras apropiadas según se desee. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature* 1986, 321, 522-525; Riechmann et al., *Nature* 1988, 332, 323-329; y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992 2, 593-596.

**[0102]** Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o codificado por el genoma humano y/o se ha realizado utilizando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos como se describe en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de CDR no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. El anticuerpo humano puede seleccionarse de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al. *Nature Biotechnology* 1996 14,309-314; Sheets et al. *PNAS (EE.UU.)*, 1998, 95, 6157-6162); Hoogenboom y el invierno, *J. Mol. Biol.*, 1991, 227, 381; Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 1991, 222, 581). Los anticuerpos humanos también pueden producirse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente inactivados. Tras el desafío, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluido el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995). Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse a través de la immortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haber sido inmunizados *in vitro*) seguido de un cribado con el antígeno de interés para un anticuerpo específico.

**[0103]** Por el término "fragmento variable de cadena única (scFv)" se entiende una fusión de las regiones  $V_H$  y  $V_L$ , unidas entre sí por un enlace corto (generalmente serina, glicina). Los anticuerpos de cadena única pueden ser polipéptidos compuestos de cadena única que tienen capacidad de unión a antígeno y que comprenden secuencias de aminoácidos homólogas o análogas a  $V_H$  y  $V_L$  ( $V_H$ - $V_L$  enlazadas o Fv de cadena única (scFv)). Tanto  $V_H$  como  $V_L$  pueden copiar secuencias de mAb naturales o una o ambas cadenas pueden comprender un constructo de CDR-FR del tipo descrito en la patente estadounidense 5.091.513. Los polipéptidos separados análogos a las regiones  $V_H$  y  $V_L$  se mantienen unidos mediante un enlazador polipeptídico. Los métodos de producción de dichos anticuerpos de cadena única, en particular cuando se conocen los ADN que codifican las estructuras polipeptídicas de las cadenas  $V_H$  y  $V_L$ , pueden llevarse a cabo de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 4.946.778, 5.091.513 y 5.096.815.

**[0104]** Una "molécula que tiene la porción de unión a antígeno de un anticuerpo" como se usa en este documento pretende incluir no solo moléculas de inmunoglobulina intactas de cualquier isotipo y generadas por cualquier línea celular o microorganismo animal, sino también su fracción reactiva de unión a antígeno, incluyendo, pero no limitado al fragmento Fab, el fragmento Fab', el fragmento  $F(ab')_2$ , la porción variable de las cadenas pesadas y/o ligeras de los mismos, mini-anticuerpos Fab (véase WO 93/15210, Solicitud de patente de EE.UU. 08/256.790, WO 96/13583, solicitud de patente de EE.UU. 08/817.788, WO 96/37621, solicitud de patente de EE.UU. 08/999.554), mini-anticuerpos biespecíficos diméricos (véase Muller et al., 1998) y quiméricos o simples anticuerpos de cadena que incorporan dicha fracción reactiva, así como cualquier otro tipo de molécula o célula en la que dicha fracción reactiva de anticuerpo se haya insertado físicamente, como un receptor de células T quimérico o una célula T que tenga dicho receptor, o moléculas desarrolladas para entregar restos terapéuticos mediante una parte de la molécula que contiene dicha fracción reactiva. Dichas moléculas pueden proporcionarse mediante cualquier técnica conocida, que incluye, pero no se limita a, escisión enzimática, síntesis de péptidos o técnicas recombinantes.

**[0105]** Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden obtenerse administrando los péptidos, análogos o células que expresan estos EMMPRIN a un animal, preferiblemente un no humano, usando protocolos de rutina. Para la preparación de mAbs, se puede usar cualquier técnica conocida en la técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares continuas. Los ejemplos incluyen diversas técnicas, como las de Kohler, G. y Milstein, C., *Nature* 256: 495-497 (1975); Kozbor et al., *Immunology Today* 4:72 (1983); Cole et al., Pág. 77-96 en anticuerpos monoclonales y terapia del cáncer, Alan R. Liss, Inc. (1985).

**[0106]** Además del método convencional de producir anticuerpos *in vivo*, los anticuerpos pueden generarse *in vitro* utilizando la tecnología de visualización de fagos. Tal producción de anticuerpos recombinantes es mucho más rápida en comparación con la producción de anticuerpos convencionales y pueden generarse contra una enorme cantidad de antígenos. Además, cuando se usa el método convencional, muchos antígenos demuestran ser no inmunogénicos o extremadamente tóxicos, y por lo tanto no pueden usarse para generar anticuerpos en animales. Además, la maduración de la afinidad (es decir, el aumento de la afinidad y la especificidad) de los anticuerpos recombinantes es muy simple y relativamente rápido. Finalmente, se pueden generar grandes cantidades de anticuerpos diferentes contra un antígeno específico en un procedimiento de selección. Para generar mAbs recombinantes, se pueden usar varios métodos, todos basados en bibliotecas de visualización para generar un gran conjunto de anticuerpos con diferentes sitios de reconocimiento de antígenos. Una biblioteca de este tipo se puede crear de varias maneras: se puede generar un repertorio sintético mediante la clonación de regiones CDR sintéticas en un conjunto de genes de la línea germinal de la cadena H y, por lo tanto, generar un gran repertorio de anticuerpos, de los cuales se pueden seleccionar fragmentos de anticuerpos recombinantes con diversas especificidades. Uno puede usar el conjunto de linfocitos de los humanos como material de partida para la construcción de una biblioteca de anticuerpos. Es posible construir repertorios ingenuos de anticuerpos IgM humanos y crear así una biblioteca humana de gran diversidad. Este método ha sido ampliamente utilizado con éxito para seleccionar un gran número de anticuerpos contra diferentes antígenos. Los protocolos para la construcción de la biblioteca de bacteriófagos y la selección de anticuerpos recombinantes se proporcionan en el texto de referencia bien conocido *Current Protocols in Immunology*, Colligan y otros (Eds.), John Wiley & Sons, Inc. (1992-2000), Capítulo 17, Sección 17.1.

**[0107]** Los anticuerpos no humanos pueden humanizarse por cualquier método conocido en la técnica. En un método, las CDR no humanas se insertan en un anticuerpo humano o secuencia consenso FR de anticuerpo. Luego se pueden introducir cambios adicionales en el marco del anticuerpo para modular la afinidad o inmunogenicidad.

**[0108]** Por ejemplo, la patente estadounidense 5.585.089 de Queen et al. describe una inmunoglobulina humanizada y métodos para prepararla, en donde la inmunoglobulina humanizada comprende CDR de una inmunoglobulina donante y FR de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de las cadenas H y L de inmunoglobulina aceptora humana, en donde dicha inmunoglobulina humanizada comprende aminoácidos de la inmunoglobulina FR del donante fuera de Kabat y Chothia CDRs, en donde los aminoácidos del donante reemplazan a los aminoácidos correspondientes en los marcos de la cadena H o L de la inmunoglobulina aceptora.

**[0109]** La Patente de EE.UU. 5.225.539, de Winter, también describe un anticuerpo alterado o fragmento de unión a antígeno del mismo y métodos para preparar el mismo, en donde un dominio V del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene las FR de una primera cadena de inmunoglobulina H o L. El dominio V y las CDR de un segundo dominio V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> de inmunoglobulina, en el que dicho segundo dominio V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> de inmunoglobulina es diferente de dicho primer dominio V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> de inmunoglobulina en la especificidad de unión a antígeno, afinidad de unión a antígeno, estabilidad, especie, clase o subclase.

**[0110]** También se comprenden Los anticuerpos antiidiotipo específicamente inmunoreactivos con un anticuerpo de la invención.

**[0111]** Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena única (Patente de Estados Unidos N° 4,946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena única contra polipéptidos o polinucleótidos de esta invención. Además, los ratones transgénicos, u otros organismos tales como otros mamíferos, pueden usarse para expresar anticuerpos humanizados específicos para los polipéptidos o polinucleótidos de la invención.

**[0112]** Alternativamente, la tecnología de visualización de fagos puede utilizarse para seleccionar genes de anticuerpos con actividades de unión hacia un polipéptido de la invención, ya sea a partir de repertorios de genes v amplificados por PCR de linfocitos de seres humanos seleccionados para detectar anti-VEGF o de bibliotecas (McCafferty, et al. al., (1990), *Nature* 348, 552-554; Marks, et al., (1992) *Bio-technology* 10, 779-783). La afinidad de estos anticuerpos también puede mejorarse, por ejemplo, mediante la combinación de cadenas (Clackson et al., (1991) *Nature* 352: 628).

**[0113]** Los anticuerpos descritos anteriormente pueden emplearse para aislar o identificar clones que expresan los polipéptidos para purificar los polipéptidos, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad.

**[0114]** También se describen variantes de aminoácidos conservativas de los péptidos y moléculas de anticuerpo de acuerdo con la invención. También se pueden hacer variantes que conserven la estructura molecular global de las proteínas o péptidos codificados. Dadas las propiedades de los aminoácidos individuales que comprenden los productos proteicos descritos, el experto en la materia reconocerá algunas sustituciones racionales. Las sustituciones de aminoácidos, es decir, "sustituciones conservativas", se pueden hacer, por ejemplo, sobre la base de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos involucrados.

Anticuerpos humanizados y humanos

**[0115]** Un anticuerpo humanizado, típicamente tiene una FR humana injertada con CDR no humanas. Por lo tanto, un anticuerpo humanizado tiene una o más secuencias de aminoácidos introducidas desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) en los que sustancialmente menos que un dominio V humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

**[0116]** La elección de los dominios  $V_H$  y  $V_L$  humanos que se usarán para preparar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la inmunogenicidad. De acuerdo con el llamado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio V de un anticuerpo de roedor se analiza contra la biblioteca completa de secuencias conocidas de dominios humanos. La secuencia humana más cercana a la del roedor se acepta luego como la FR humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método utiliza una FR particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas H o L. La misma FR se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

**[0117]** Es además importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta especificidad y afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Hay disponibles programas de computadora que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas pantallas permite el análisis del posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar desde el receptor y las secuencias de importación para que se logre la característica deseada del anticuerpo, como el aumento de la afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de CDR están directa y más sustancialmente involucrados en influir en la unión del antígeno.

**[0118]** Alternativamente, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada ( $J_H$ ) del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal produce una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl Acad Sci. EE.UU.*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993); BruG-Germann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y Duchosal et al. *Nature* 355: 258 (1992). Los anticuerpos humanos también pueden derivar de bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991); Vaughan et al., *Nature Biotech* 14:309 (1996)).

#### 50 Fragmentos de anticuerpos

**[0119]** Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y otros, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan y otros, *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos  $F(ab')_2$  (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos  $F(ab')_2$  se pueden aislar directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la materia. El anticuerpo de elección puede ser un fragmento Fv de una sola cadena (scFv).

**[0120]** Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con un péptido o un anticuerpo de acuerdo con la invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidas aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en el presente documento incluyen tumores benignos y malignos; leucemias y neoplasias linfoides; trastornos

neuronales, gliales, astrocitos, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrófagos, epiteliales, estromales y blastocélicos; y estados inflamatorios, angiogénicos, inmunológicos o estados de hiperpermeabilidad.

**[0121]** El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, frenar en cierta medida y preferiblemente detener) el crecimiento local de células cancerosas, inhibir la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en que el medicamento pueda prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* se puede medir, por ejemplo, evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.

**[0122]** "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que se va a prevenir el trastorno.

#### Vacunación terapéutica o inmunoterapia:

**[0123]** Existen varias opciones en inmunoterapias contra el cáncer. La prevalente es el uso de inyecciones repetidas de refuerzo de anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales o proteínas que desempeñan un papel importante en la promoción de tumores. Ejemplos de tales tratamientos son el uso de anti-VEGF (Avastin™) o anti-Her2/neu (Herceptin™). Esta estrategia de inmunización pasiva emplea las funciones efectoras de los anticuerpos que pueden atacar a las células tumorales y etiquetarlas para su destrucción (por ejemplo, complemento, macrófagos, ADCC) o inhibir la actividad de la proteína (por ejemplo, el bloqueo de la angiogénesis). Sin embargo, elude la activación completa de la respuesta inmune y la generación de memoria inmune.

**[0124]** En contraste, las estrategias de vacunación activa se basan en la presentación del determinante antigénico a las células T, activando los brazos innatos y adaptativos de la respuesta inmune y generando memoria inmune. Hoy en día, las vacunas contra antígenos tumorales utilizan inyecciones de lisados de células tumorales, células tumorales modificadas genéticamente, células dendríticas cargadas con el antígeno, proteínas purificadas u otras macromoléculas, o las vacunas basadas en péptidos recientemente desarrolladas. La mayoría de estas estrategias de vacunación también emplean un adyuvante para mejorar la potencia de la respuesta inmune.

**[0125]** Las vacunas se usan más comúnmente como agentes profilácticos, para prevenir o amortiguar el efecto perjudicial de una futura infección con el deseo de mantener una protección prolongada. Sin embargo, las vacunas también pueden usarse terapéuticamente, para tratar una enfermedad existente, y dado que provocan una respuesta inmune, también pueden proporcionar una protección duradera. Así, se acuñó el término vacunación terapéutica. Se pueden encontrar varios ejemplos de vacunación terapéutica contra el cáncer (Gonzalez G et al. *Curr. Cancer Drug target* 2011 Jan; 11 (1): 103-10; Van Poppel H et al., *Eur. Urol.* 2009 Jun; 55 (6) : 1333-42; Berge G, et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 2010 Aug; 59 (8): 1285-94). La vacunación terapéutica puede prevenir la progresión de una enfermedad existente, o puede revertir la enfermedad.

**[0126]** La vacunación terapéutica y la inmunización pasiva se pueden combinar en un solo régimen de tratamiento.

**[0127]** Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de pulmón de escamas), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal (incluido el cáncer gastrointestinal), cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, riñón o cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de células B (incluido el linfoma no Hodgkin (LNH) de grado bajo/folicular; linfocítico pequeño (SL)) LNH; LNH folicular/grado intermedio; LNH difusa de grado intermedio; LNH inmunoblástica de grado alto; LNH linfoblástica de grado alto; LNH de células no escindidas pequeñas de alto grado; LNH de enfermedad voluminosa; mphoma; linfoma relacionado con el SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (LLA); Leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y el trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), así como la proliferación vascular anormal asociada con las facomatosis, edema (como el asociado con tumores cerebrales) y el síndrome de Meigs.

**[0128]** El término "composición antineoplásica" se refiere a una composición útil para tratar el cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo capaz de inhibir o prevenir el crecimiento o la función del tumor o la metástasis, y/o causar la destrucción de células tumorales. Los agentes terapéuticos adecuados en una composición

antineoplásica para tratar el cáncer incluyen, entre otros, agentes quimioterapéuticos, isótopos radiactivos, toxinas, citoquinas, como los interferones, y agentes antagónicos dirigidos a citoquinas, receptores de citoquinas o antígenos asociados con células tumorales. Por ejemplo, los agentes terapéuticos útiles en la presente invención pueden ser anticuerpos tales como anticuerpo anti-HER2 y anticuerpo anti-CD20, o inhibidores de quinasa de tirosina de molécula pequeña tales como inhibidores del receptor de VEGF e inhibidores del receptor de EGF. Preferiblemente, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

**[0129]** Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN<sup>RTM</sup>; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilaminasas que incluyen altretamina, trietilenemelamina, trietilenfosforamida, trietilenofosforamida y trimetillomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacin y bullatacinona); una campotecina (incluido el topotecán análogo sintético); briostatina; callystatin; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistina; mostazas nitrogenadas como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecholetamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mosto de uracil; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos como los antibióticos enediyina (p. ej., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omegal1 (véase, p. ej., Agnew, Chem Intl. Ed. Engl. 33: 183-186 (1994))); dinicina, incluida la dinemicina A; bifosfonatos como clodronato, esperamicina, cromóforos de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos relacionados con cromoproteína enediyina, aclacinomicinas actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN<sup>TM</sup> doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y deoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos como el metotrexato y el 5-fluorouracil (5 FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidin tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitiostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina demecolcina diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxidurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK<sup>RTM</sup> (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquna; 2,2', 2"-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manacustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., TAXOL<sup>RTM</sup> Paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), ABRAXANE<sup>TM</sup> libre de crememorfos, nanopartículas de albúmina con ingeniería de albúmina, Illinco, y TAXOTERE<sup>RTM</sup> doxetaxel (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucil; gemcitabina GEMZAR<sup>RTM</sup>; 6-tioguanina; mercaptopurina; metopurina; metoplatina; ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina NAVELBINE<sup>RTM</sup>, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterina, xeloda, iinoda, omandronato, por ejemplo, CPT-11; tinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

**[0130]** También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores como los antiestrógenos y los moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluido el tamoxifeno NOLVADEX<sup>RTM</sup>), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON; inhibidores de la aromataza que inhiben la enzima aromataza, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE<sup>RTM</sup>, antivestano AROMASIN<sup>RTM</sup>, y anastrozol ARIMIDEX<sup>RTM</sup>; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de citosina nucleósido 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME<sup>RTM</sup>) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas como la terapia basada en genes, vacunas basadas en ADN, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN<sup>RTM</sup>, vacuna LEUVECTIN<sup>RTM</sup> y vacuna VAXID<sup>RTM</sup>; PROLEUKIN<sup>RTM</sup> rIL-2; LURTOTECAN<sup>RTM</sup> inhibidor de la topoisomerasa 1; ABARELIX<sup>RTM</sup> rmRH; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

## 65 Farmacología

**[0131]** La presente invención también contempla formulaciones farmacéuticas o composiciones para uso médico humano. Las composiciones farmacéuticas pueden ser composiciones de vacuna, que comprenden como agente activo al menos un péptido EMMPRIN, análogo de péptido, multímero o conjugado.

## 5 Formulaciones de vacunas

**[0132]** Las composiciones de vacunas pueden comprender al menos un péptido, análogo de péptido o conjugado o proteína de fusión que lo comprende, y opcionalmente, un adyuvante. La formulación puede contener una variedad de aditivos, como adyuvantes, excipientes, estabilizantes, tampones o conservantes. La vacuna se puede formular para su administración en uno de los muchos modos diferentes.

**[0133]** La vacuna se puede formular para administración parenteral, por ejemplo, administración intramuscular o subcutánea. La administración puede ser intradérmica. Las agujas diseñadas específicamente para depositar la vacuna por vía intradérmica son conocidas en la técnica como se describe, por ejemplo, en 6.843.781 y 7.250.036 entre otras. La administración se puede realizar con un inyector sin agujas.

**[0134]** Alternativamente, la vacuna puede administrarse por vía intranasal. La formulación de la vacuna se puede aplicar al tejido linfático de la nariz de cualquier manera conveniente. Sin embargo, se prefiere aplicarlo como una corriente líquida o gotitas de líquido a las paredes del conducto nasal. La composición intranasal se puede formular, por ejemplo, en forma líquida como gotas nasales, en aerosol o adecuada para inhalación, como polvo, como crema o como emulsión.

**[0135]** La formulación de estas modalidades es de conocimiento general para los expertos en la técnica.

**[0136]** Los liposomas proporcionan otro sistema de administración para la administración y presentación de antígenos. Los liposomas son vesículas de dos capas compuestas de fosfolípidos y otros esteroides que rodean un centro típicamente acuoso donde pueden ser encapsulados antígenos u otros productos. La estructura del liposoma es muy versátil, con muchos tipos de tamaños desde nanómetros a micrómetros, desde aproximadamente 25 nm hasta aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ . Se ha encontrado que los liposomas son eficaces en la administración de agentes terapéuticos a las superficies dérmicas y de la mucosa. Los liposomas pueden modificarse adicionalmente para su administración dirigida, por ejemplo, incorporando anticuerpos específicos en la membrana de la superficie, o alterados para encapsular bacterias, virus o parásitos. El tiempo de supervivencia promedio o la vida media de la estructura de liposoma intacta se puede extender con la inclusión de ciertos polímeros, por ejemplo, polietilenglicol, permitiendo la liberación prolongada *in vivo*. Los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares. El método para la encapsulación de antígenos en liposomas es bien conocido en la técnica.

**[0137]** Las micropartículas y nanopartículas emplean pequeñas esferas biodegradables que actúan como depósitos para el suministro de vacunas y también se pueden usar para administrar las formulaciones de vacunas descritas en el presente documento. La principal ventaja que poseen las microesferas de polímeros sobre otros adyuvantes que afectan a los depósitos es que son extremadamente seguras y han sido aprobadas por la Administración de Medicamentos y Alimentos de EE.UU. Para su uso en medicina humana como suturas adecuadas y para su uso como un sistema de suministro de fármacos biodegradable (Langer R. Science. 1990; 249 (4976): 1527-33). Las velocidades de hidrólisis del copolímero están muy bien caracterizadas, lo que a su vez permite la fabricación de micropartículas con liberación sostenida de antígenos durante períodos prolongados de tiempo (O'Hagen, et al., Vaccine, 1993; 11 (9): 965-9).

**[0138]** La administración parenteral de micropartículas provoca inmunidad de larga duración, especialmente si incorporan características de liberación prolongada. La velocidad de liberación puede ser modulada por la mezcla de polímeros y sus pesos moleculares relativos, que se hidrolizarán durante períodos de tiempo variables. Sin desear estar ligados a la teoría, la formulación de partículas de diferentes tamaños (1  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ ) también puede contribuir a respuestas inmunológicas de larga duración, ya que las partículas grandes deben descomponerse en partículas más pequeñas antes de estar disponibles para la captación de macrófagos. De esta manera, se podría desarrollar una vacuna de inyección única integrando varios tamaños de partículas, prolongando así la presentación de antígenos y beneficiando enormemente a los ganaderos.

**[0139]** En algunas aplicaciones, se puede incluir un adyuvante o excipiente en la formulación de la vacuna. Montanide™ (adyuvante de Freund completo) y alumbre, por ejemplo, son adyuvantes preferidos para uso humano. La elección del adyuvante se determinará en parte por el modo de administración de la vacuna. Un modo preferido de administración es la administración intramuscular. Otro modo preferido de administración es la administración intranasal. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes intranasales incluyen polvo de quitosán, microesferas de PLA y PLG, QS-21, AS02A, nanopartículas de fosfato de calcio (CAP); mCTA/LTB (toxina del cólera mutante E112K con subunidad pentamérica B de enterotoxina lábil al calor) y toxina lábil derivada de *E. coli* detoxificada.

**[0140]** El adyuvante usado también puede ser, teóricamente, cualquiera de los adyuvantes conocidos para vacunas basadas en péptidos o proteínas. Por ejemplo: adyuvantes inorgánicos en forma de gel (hidróxido de aluminio/fosfato de aluminio); adyuvantes bacterianos tales como monofosforil lípido A y péptidos muramilo;

Adyuvantes en partículas tales como los denominados ISCOMS ("complejos inmunoestimulantes"), liposomas y microesferas biodegradables; adyuvantes a base de emulsiones de aceite y emulsionantes como IFA ("adyuvante incompleto de Freund"), SAF, saponinas (como QS-21), escualeno/escualano; adyuvantes sintéticos tales como copolímeros de bloque no iónicos, análogos de péptido muramilo, lípido A sintético, polinucleótidos sintéticos y adyuvantes policationicos.

**[0141]** Los adyuvantes para uso con inmunógenos incluyen sales de aluminio o calcio (por ejemplo, sales de hidróxido o fosfato). Un adyuvante particularmente preferido para uso en la presente invención es un gel de hidróxido de aluminio tal como Alhidroge<sup>TM</sup>. Las nanopartículas de fosfato de calcio (CAP) son un adyuvante desarrollado por Biosante, Inc (Lincolnshire, Illinois). El inmunógeno de interés puede estar recubierto en el exterior de las partículas o encapsulado en el interior (He et al 2000, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 7 (6): 899-903).

**[0142]** Otro adyuvante para uso con un inmunógeno es una emulsión. Una emulsión contemplada puede ser una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite. Además de las partículas de proteína química inmunógenas, tales emulsiones comprenden una fase oleosa de escualeno, escualano, aceite de cacahuete o similares, como es bien conocido, y un agente dispersante. Se prefieren los agentes dispersantes no iónicos y tales materiales incluyen ésteres de ácidos grasos mono- y di-C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub> de sorbitán y manuro, tales como monoestearato de sorbitán, monooleato de sorbitán y monooleato de manuro.

**[0143]** Dichas emulsiones son, por ejemplo, emulsiones de agua en aceite que comprenden escualeno, glicerol y un agente tensioactivo tal como mononleato de manida (Arlacel<sup>TM</sup> A), opcionalmente con escualano, emulsionado con las partículas de proteína química en una fase acuosa. Los componentes alternativos de la fase oleosa incluyen alfa-tocoferol, di- y tri-glicéridos de cadena mixta y ésteres de sorbitán. Los ejemplos bien conocidos de tales emulsiones incluyen Montanide<sup>TM</sup> ISA-720 y Montanide<sup>TM</sup> ISA 703 (Seppic, Castres, Francia. Otros adyuvantes de emulsión de aceite en agua incluyen los descritos en los documentos WO 95/17210 y EP 0 399 843.

**[0144]** El uso de adyuvantes de molécula pequeña también se contempla en el presente documento. Un tipo de adyuvante de molécula pequeña útil en el presente documento es un derivado 8-sustituido-8-oxo u 8-sulfoguanosina descrito en la Patente de EE.UU. N° 4.539.205, Patente de EE.UU. 4.643.992, Patente de EE.UU. 5.011.828 y Patente de EE.UU. 5.093.318. 7-alil-8-oxoguanosina (Ioxoribina) ha demostrado ser particularmente eficaz en la inducción de una respuesta específica antígeno (inmunógeno).

**[0145]** Un adyuvante útil incluye monofosforil lípido A (MPL®), 3-deacil monofosforil lípido A (3D-MPL®), un adyuvante bien conocido fabricado por Corixa Corp. de Seattle, anteriormente Ribi Immunochem, Hamilton, Mont. El adyuvante contiene tres componentes extraídos de bacterias: monofosforil lípido (MPL) A, trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS) (MPL + TDM + CWS) en una emulsión de escualeno/Tween<sup>TM</sup> 80 al 2%. Este adyuvante se puede preparar por los métodos enseñados en GB 2122204B.

**[0146]** Otros compuestos están relacionados estructuralmente con el adyuvante MPL® llamados fosfatos de glucosamida de aminoalquil (AGP), tales como los disponibles en Corixa Corp bajo la designación adyuvante RC-529<sup>TM</sup> {2-[(R)-3-tetra-decanoiloxitetradecanoilamino]-etil-2-desoxi-4-O-fosfon- o-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilo]-2-[(R)-3-tetra-decanoiloxiteto-radecanoil-amino]-p-D-glucopiranosida sal de trietilamonio}. Un adyuvante RC-529 está disponible en una emulsión de escualeno vendida como RC-529SE y en una formulación acuosa como RC-529AF disponible en Corixa Corp. (véase, Patente de EE.UU. N° 6.355.257 y Patente de EE.UU. N° 6.303.347; Patente de EE.UU. N° 6.113.918 y la Publicación de EE.UU. N° 03-0092643).

**[0147]** Los adyuvantes contemplados adicionalmente incluyen adyuvantes oligonucleotídicos sintéticos que contienen el motivo de nucleótido CpG una o más veces (más secuencias flanqueantes) disponibles de Coley Pharmaceutical Group. El adyuvante designado QS21, disponible en Aquila Biopharmaceuticals, Inc., es una fracción de saponina inmunológicamente activa que tiene actividad adyuvante derivada de la corteza del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina (por ejemplo, Quil<sup>TM</sup> A), y el método de su producción se describe en la Patente de EE.UU. N° 5,057.540. Los derivados de Quil<sup>TM</sup> A, por ejemplo QS21 (un derivado de la fracción purificada por HPLC de Quil<sup>TM</sup> A también conocido como QA21), y otras fracciones como QA17 también se describen. Los derivados semisintéticos y sintéticos de las saponinas de Quillaja Saponaria Molina también son útiles, tales como los descritos en la Patente de EE.UU. N° 5.977.081 y la patente de EE.UU. N° 6.080.725. El adyuvante denominado MF59 disponible en Chiron Corp. se describe en la patente de EE.UU. N° 5.709.879 y la patente de EE.UU. N° 6.086.901.

**[0148]** También se contemplan adyuvantes de dipéptido de muramil e incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (th-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina [CGP 11637, referido como nor-MDP], y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitol-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi) etilamina [(CGP) 1983A, referido como MTP-PE]. Los denominados análogos del dipéptido de muramil se describen en la patente de EE.UU. N° 4,767.842.

**[0149]** Otras mezclas de adyuvantes incluyen combinaciones de 3D-MPL y QS21 (EP 0 671 948 B1), emulsiones de aceite en agua que comprenden 3D-MPL y QS21 (WO 95/17210, PCT/EP98/05714), 3D-MPL formulado con otros

vehículos (documento EP 0 689 454 B1), QS21 formulado en liposomas que contienen colesterol (documento WO 96/33739) u oligonucleótidos inmunoestimulantes (documento WO 96/02555). El adyuvante SBAS2 (ahora ASO2) contiene QS21 y MPL en una emulsión de aceite en agua también es útil. Los adyuvantes alternativos incluyen los descritos en el documento WO 99/52549 y suspensiones no particuladas de éter de polioxietileno (solicitud de patente del Reino Unido N° 9807805.8).

**[0150]** El uso de un adyuvante que contiene uno o más agonistas para el receptor 4 similar a peaje (TLR-4) como un adyuvante MPL® o un compuesto relacionado estructuralmente como un adyuvante RC-529® o un mimético de lípido A, solo o junto con un agonista para TLR-9, tal como un oligo desoxinucleótido no metilado que contiene el motivo CpG, también es opcional.

**[0151]** Otro tipo de mezcla de adyuvante comprende una emulsión estable de agua en aceite que contiene además fosfatos de glicosamina de aminoalquil, tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 6.113.918. De los fosfatos de glucosamina de aminoalquil, la molécula conocida como RC-529 {(2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil-2-deoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-pD-glucopiranosida sal de trietilamonio.)) es la más preferida. Una emulsión de agua en aceite preferida se describe en el documento WO 99/56776.

**[0152]** Los adyuvantes se utilizan en una cantidad de adyuvante, que puede variar con el adyuvante, el animal huésped y el inmunógeno. Las cantidades típicas pueden variar de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1 mg por inmunización. Los expertos en la materia saben que las concentraciones o cantidades apropiadas pueden determinarse fácilmente.

**[0153]** Las composiciones de vacunas descritas en el presente documento pueden contener uno o más adyuvantes, caracterizados porque están presentes como una solución o emulsión que está sustancialmente libre de iones de sales inorgánicas, en donde dicha solución o emulsión contiene una o más soluciones solubles en agua o emulsionables en agua. Sustancias capaces de hacer la vacuna isotónica o hipotónica. Las sustancias solubles en agua o emulsionables en agua pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en: maltosa; fructosa; galactosa; sacarosa; alcohol de azúcar; lípido y combinaciones de los mismos.

**[0154]** Las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender un adyuvante proteosoma. El adyuvante proteosoma comprende una preparación purificada de proteínas de la membrana externa de meningococos y preparaciones similares de otras bacterias. Estas proteínas son altamente hidrófobas, lo que refleja su papel como proteínas transmembrana y porinas. Debido a sus interacciones hidrofóbicas proteína-proteína, cuando se aíslan apropiadamente, las proteínas forman estructuras multimoleculares que consisten en vesículas de membrana completas o fragmentadas de aproximadamente 60-100 nm de diámetro. Este estado físico similar a un liposoma permite que el adyuvante proteosoma actúe como un portador de proteínas y también que actúe como adyuvante.

**[0155]** Las composiciones de vacuna pueden incluir, por ejemplo, polipéptidos de influenza o epítopos peptídicos, conjugados con o acoplados a al menos un péptido derivado de EMMPRIN de acuerdo con la invención.

**[0156]** Una dosis típica para una vacuna basada en péptidos está en el rango de 10 µg a 10 mg, y la administración es típicamente de 3 dosis de cebado mensuales seguidas de refuerzos en un intervalo de 1 a 4 meses. Otras dosis y regímenes de vacunación son posibles. La dosis exacta y el regimiento se determinarán para cada antígeno específico y formulación utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

**[0157]** De acuerdo con otras realizaciones, una composición farmacéutica según la invención comprende al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que reconoce un determinante antigénico peptídico descrito en la presente invención. Las composiciones farmacéuticas que comprenden dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo pueden usarse para la inmunización pasiva o para el tratamiento de una enfermedad o trastorno existente.

**[0158]** En tales formulaciones farmacéuticas y de medicamentos, el agente activo se utiliza preferiblemente junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, cualquier otro ingrediente terapéutico. El (los) vehículo(s) deben ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser excesivamente perjudiciales para el receptor de la misma. El agente activo se proporciona en una cantidad efectiva para lograr el efecto farmacológico deseado, como se describe anteriormente, y en una cantidad apropiada para lograr la dosis diaria deseada.

**[0159]** Típicamente, las moléculas comprenden la porción de unión a antígeno de un anticuerpo o que comprenden un péptido, análogo de péptido, multímero de péptido o conjugado de péptido que se suspenderán en una solución salina estéril para usos terapéuticos. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse alternativamente para controlar la liberación de ingrediente activo (molécula que comprende la porción de unión a antígeno de un anticuerpo) o para prolongar su presencia en el cuerpo de un paciente. Se conocen numerosos sistemas adecuados de administración de fármacos e incluyen, por ejemplo, sistemas de liberación de fármacos implantables, hidrogeles, hidroximetilcelulosa, microcápsulas, liposomas, microemulsiones, microesferas y similares. Las preparaciones de

liberación controlada pueden prepararse mediante el uso de polímeros para complejar o adsorber la molécula. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de poli(etileno-co-acetato de vinilo) y matrices de un copolímero de polianhídrido de un dímero de ácido esteárico y ácido sebarico. La velocidad de liberación de la molécula, es decir, de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, de una matriz de este tipo depende del peso molecular de la molécula, la cantidad de la molécula dentro de la matriz y el tamaño de las partículas dispersas.

**[0160]** La composición farmacéutica de esta invención puede administrarse por cualquier medio adecuado, tal como por vía oral, tópica, intranasal, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraarticular, intralesional o parenteral. Generalmente, se preferirá la administración intravenosa (iv), intraarticular, tópica o parenteral.

**[0161]** Será evidente para los expertos en la materia que la cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula dependerá, entre otras cosas, del programa de administración, la dosis unitaria de la molécula administrada, si la molécula se administra en combinación con otros fármacos, agentes, el estado inmune y la salud del paciente, la actividad terapéutica de la molécula administrada y el juicio del médico tratante. Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de una molécula requerida para aliviar uno o más síntomas asociados con un trastorno que se trata durante un período de tiempo.

**[0162]** Aunque la dosis apropiada de una molécula varía según la vía de administración, el tipo de molécula (polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica, etc.) edad, peso corporal, sexo o condiciones del paciente, se determinará por el médico al final. En el caso de la administración parenteral, la dosificación diaria generalmente puede ser de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg, preferiblemente de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 mg, por kg de peso corporal. La dosis se puede administrar, por ejemplo, en regímenes semanales, quincenales, mensuales o bimensuales. Otros métodos preferidos de administración incluyen la administración intraarterial de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal. Se describen varias consideraciones para llegar a una cantidad efectiva, por ejemplo, en Goodman and Gilman: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª ed., Pergamon Press, 1990; y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 1990.

**[0163]** Los regímenes de dosificación adecuados de quimioterapia de combinación son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Saltz et al. Proc ASCO 1999, 18, 233a y Douillard et al., Lancet 2000, 355, 1041-7.

**[0164]** Las moléculas como ingredientes activos se disuelven, dispersan o se mezclan en un excipiente que es farmacéuticamente aceptable y compatible con el ingrediente activo como es bien conocido. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Otros vehículos adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores de pH.

**[0165]** Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar cómo hacer y usar los compuestos y métodos de esta invención y no deben interpretarse como una limitación. Aunque la invención se describirá ahora junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. En consecuencia, se pretende abarcar todas las modificaciones y variaciones que caen dentro del espíritu y amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## EJEMPLOS

**[0166]** Los medios para preparar y caracterizar péptidos aislados, análogos de péptidos, multímeros de péptidos, proteínas de fusión y anticuerpos de unión son bien conocidos en la técnica. A continuación se proporciona una descripción para ejemplificar técnicas para la producción y uso de péptidos y moléculas EMMPRIN que los comprenden y anticuerpos de unión a EMMPRIN de acuerdo con la presente invención.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**[0167]** *Células:* el carcinoma renal tumorigénico RENCA y el carcinoma de colon CT26, así como las líneas celulares RAW 264,7 (ATCC TIB-71) similares a macrófagos, se derivan de ratones Balb/C. La línea celular TRAMP-C2 de cáncer de próstata se deriva de ratones C57BL/6. Todas las líneas celulares se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 10% de suero de ternera fetal (FCS), 1% de L-glutamina y antibióticos, y se divide dos veces por semana en una proporción de 1:4. Todas las líneas celulares se analizaron regularmente para detectar cambios morfológicos y presencia de micoplasma.

**[0168]** Para los experimentos, se sembraron  $10^6$  células tumorales/0,5 ml en una placa de 24 pocillos en medio sin suero, para evitar el posible enmascaramiento de señales iniciadas por los estímulos exógenos. En los cocultivos, se sembraron  $0,5 \times 10^6$  células tumorales y  $0,5 \times 10^6$  macrófagos RAW 264,7 en 0,5 ml de medio sin suero. En algunos experimentos, en lugar de 264,7 células RAW, se usaron macrófagos liberados de tioglicolato peritoneal primario (TG) que se recolectaron del peritoneo de ratones Balb/C por lavado peritoneal 4 días después de la inyección ip de

tioglicolato (3 ml de 24 mg/ml). Los macrófagos se adhirieron primero al plástico durante 2 h en un medio con 20% de FCS y, después de un lavado exhaustivo para eliminar las células no adheridas, se rasparon de la placa, se contaron y se llevaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL en suero. medio libre. Todas las células se incubaron durante 48 horas sin ninguna estimulación adicional, y la viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo XTT (Biological Industries, Beit-Ha'emek, Israel).

**[0169] Citometría de flujo:** Para determinar la expresión de EMMPRIN de superficie, las células se recolectaron al final del experimento, se centrifugaron y se resuspendieron en medio de 100  $\mu$ l que contenía FCS al 1% con 2  $\mu$ l de isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-EMMPRIN conjugado. Después de 30 minutos de incubación en la oscuridad a 4°C, las células se centrifugaron y se resuspendieron con 500 mL que contenían formaldehído al 0,5%. El porcentaje de células positivas que expresaban EMMPRIN de superficie y la intensidad fluorescente media (MF) se midieron utilizando el citómetro de flujo BD LSR-II.

**[0170] Análisis de inmunotransferencia:** EMMPRIN recombinante de ratón (200 ng/carril) se cargó en una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE), se separó electroforéticamente y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó durante la noche a 4°C en tampón de bloqueo y luego se cortó en tiras. Cada tira se probó durante 1 hora a temperatura ambiente con suero inmune o preinmune diluido (1:1.000 en solución salina tamponada con fosfato-PBS). Las tiras se lavaron tres veces en solución salina tamponada con Tris 1x con Tween 20 (TBST) y luego se incubaron con IgG anti-rata de cabra conjugada con peroxidasa rojiza (HRP) durante 1 hora adicional a temperatura ambiente. maduración, seguido de cuatro lavados adicionales en 1xTBST. El sistema de quimioluminiscencia mejorada (ECL), que contiene el sustrato de la enzima HRP, se utilizó para la detección de proteínas. Se probó una tira con el EMMPRIN anti-ratón de rata y el IgG anti-ratón de burro, y sirvió como control positivo (PC).

**[0171] ELISA:** MMP-9 y VEGF se cuantificaron utilizando los kits ELISA comerciales de DuoSet de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN), utilizando una curva estándar. Las muestras de los sobrenadantes de cultivo se diluyeron 1:10 para MMP-9 y 1:100 para VEGF.

**[0172] ELISA indirecto:** este ensayo se desarrolló para determinar la especificidad de los anticuerpos policlonales para la proteína EMMPRIN. EMMPRIN recombinante de ratón (mrEMMPRIN, 200 ng/ml en PBS, R&D Systems) o la porción Fc de la IgG humana se aplicaron a los pocillos de una placa de 96 pocillos y se incubaron a 4°C durante la noche para recubrir los pocillos. El exceso de antígenos se eliminó lavando tres veces con tampón de lavado (Tween-20 al 0,05% en PBS), seguido de bloqueo de los sitios de unión a proteínas libres restantes con tampón de bloqueo (BSA al 1% en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavados adicionales, se recubrieron tiras de EMMPRIN o Fc recombinante de ratón con cada uno de los anticuerpos primarios (sueros inmunes o preinmunes) diluidos 1:5000 y 1:5000 en PBS, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavados adicionales, se añadió el asno anti-conejo conjugado con HRP diluido 1:10.000 (80 ng/ml) y se incubó durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente, seguido de cuatro lavados e incubación con solución de TMB durante 5 minutos. Los pocillos de control positivo se incubaron con EMMPRIN antirratón de rata comercial (0,5 mg/ml), luego con el anticuerpo de cabra secundario conjugado con HRP anti-rata de cabra diluido 1:1.000 (0,4 mg/ml). La reacción se detuvo con solución de parada (HCl 0,25 M) y la absorbancia de cada pocillo se midió a 450 nm y a una referencia de 540 nm. Los valores de OD de la unión de Fc se restaron de los valores de OD de los valores de unión de EMMRPIN recombinante de ratón.

**[0173] Conjugación de péptidos, inmunización y purificación por afinidad de anticuerpos policlonales:** Los péptidos diseñados se sintetizaron (Adar Biotech, LTD, Rehovot, Israel) y se conjugaron con la proteína portadora de hemocianina de lapa californiana (KLH), luego se utilizaron para inmunizar dos conejos con cada péptido, que se sangraron antes (sueros preinmunes) y después de cada inmunización. Para detectar una respuesta de anticuerpos, se diseñó y usó un ELISA, donde se determinó el título de los anticuerpos de acuerdo con su nivel de unión a cada péptido. Los sueros se recogieron después de cada inyección de refuerzo, y los anticuerpos policlonales antipéptido se purificaron en una cromatografía de afinidad de péptidos.

**[0174]** Los anticuerpos policlonales se producen preferiblemente en animales mediante inyecciones subcutáneas múltiples (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno peptídico relevante a una proteína con epítopos de células T en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutar-aldehído, anhídrido succínico,  $\text{SOCl}_2$  o  $\text{R}^1\text{N} = \text{C} = \text{NR}$ , donde R y  $\text{R}^1$  son grupos alquilo diferentes.

**[0175]** Los animales se inmunizan contra el antígeno peptídico, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 mg o 5 mg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de CFA e inyectando la solución por vía intradérmica a múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en IFA mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después, los animales se sangran y el suero se analiza para determinar el título de anticuerpos. Los animales son reforzados de la misma manera hasta la meseta de titulación. El animal también

puede reforzarse con un conjugado del mismo antígeno pero conjugado con una proteína transportadora diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden hacer en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, los agentes de adsorción y depósito tales como el alumbre se usan adecuadamente para mejorar la respuesta inmune.

**[0176] Síntesis de péptidos ramificados:** las secuencias de péptidos que se usaron para generar los anticuerpos policlonales se sintetizaron como un péptido ramificado utilizando la técnica de péptidos antigénicos múltiples (MAP) (Tam JP. Proc Natl Acad Sci US A. 1988; 85: 5409-5413.). En esta técnica, la secuencia peptídica se conjuga con una matriz central de residuos de lisina (Lys), formando así un péptido ramificado (por ejemplo, péptido octa-ramificado que usa 8 residuos de Lys). El esqueleto peptídico altamente cargado aumenta la inmunogenicidad del péptido, por lo que la conjugación con una proteína portadora ya no es necesaria para obtener altos títulos de anticuerpos policlonales.

#### **Modelos de tumores *in vivo* y vacunación:**

**[0177] Ratones:** Se mantuvieron ratones Balb/C (hembras, 8 semanas de edad) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y acceso a alimentos y agua ad libitum. Los ratones fueron atendidos de acuerdo con los procedimientos aprobados por el Comité Technion para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y se describen en las Directrices del Instituto Nacional de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Los tumores se generaron mediante la inyección sc de  $2 \times 10^6$  células tumorigénicas suspendidas en 200 mL de Matrigel™ en el flanco de ratones Balb/C (para células RENCA y CT26). Luego se midieron los tumores cada 3-4 días, y se calcularon sus volúmenes (longitud x anchura x  $0,5 \text{ cm}^3$ ). Los ratones se sacrificaron al final del experimento o cuando los tumores crecieron más de  $1,0\text{-}1,5 \text{ cm}^3$ . Para los modelos metastásicos, se generaron metástasis pulmonares tumorales inyectando  $1 \times 10^6$  células tumorigénicas en 200 mL de PBS en la vena de la cola. Después de 14-16 días (para el modelo CT26) o después de 21-23 días (para el modelo RENCA), los ratones se sometieron a eutanasia y se extrajeron los pulmones. El número de metástasis se contabilizó bajo un microscopio de disección.

**[0178] Inmunización pasiva:** A ratones Balb/C hembra (8 semanas de edad, 20-25 gr) se les inyectaron células RENCA o CT26, y cuando los tumores se hicieron palpables (día 13 para los tumores RENCA, y en el día 15 para los tumores CT26), Los ratones fueron asignados al azar a cinco grupos. El grupo de control se inyectó ip tres veces con 2 ml de solución salina, y los otros grupos se inyectaron ip con diferentes concentraciones del anticuerpo 161 ( $100 \mu\text{g}/2 \text{ ml}$ ,  $50 \mu\text{g}/2 \text{ ml}$  y  $25 \mu\text{g}/2 \text{ ml}$ ) u otro. Anticuerpo anti-EMMPRIN no inhibidor (el anticuerpo 162,  $100 \mu\text{g}/2 \text{ ml}$ ), en tres refuerzos, cada 6 días. Se midieron las dimensiones del tumor y se calcularon sus volúmenes.

**[0179] Inmunización activa:** Se inyectaron ratones RENCA o CT26 hembra a ratones Balb/C (8 semanas de edad, 20-25 gr) como se describe anteriormente. En los días 7, 14 y 21 después de la primera inyección, los ratones se anestesiaron ligeramente (isofluran al 3%) y cantidades crecientes de péptido ( $10 \mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ ,  $25 \mu\text{g}/30 \mu\text{l}$  y  $50 \mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ ) se disolvieron en CFA (primer refuerzo) o IFA (las inyecciones de segundo y tercer impulso se inyectaron en la almohadilla de cada ratón. El cuarto grupo recibió inyecciones de CFA o IFA solamente. Se midieron las dimensiones del tumor y se calcularon sus volúmenes.

**[0180] Análisis estadísticos:** Todos los valores se presentan como medios  $\pm$  SE (error estándar). Los datos se analizaron utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA). La prueba de comparación múltiple Student Newman-Keuls se utilizó para evaluar la importancia entre los grupos experimentales, y los valores de  $p > 0,05$  no se consideraron estadísticamente significativos. Para los experimentos de modelos de tumores *in vivo*, se utilizó ANOVA de dos vías para determinar los efectos del tiempo y las concentraciones de anticuerpos/péptidos en la tasa de crecimiento del tumor.

#### **Ejemplo 1. Diseño de péptidos y especificidad de los anticuerpos.**

**[0181]** A diferencia de los experimentos previos, que utilizaron la porción extracelular completa de la proteína EMMPRIN para generar anticuerpos policlonales y monoclonales, el objetivo de este estudio fue mapear el (los) epítipo(s) peptídico(s) preciso(s) que son responsable(s) de la inducción de VEGF y/o MMP-9. Al diseñar y elegir los péptidos que se utilizarán para aumentar los anticuerpos policlonales, se examinaron todos los dominios de la porción extracelular conocida de EMMPRIN. Los péptidos hidrófilos que se encuentran en la parte exterior de la proteína y, por lo tanto, son más antigénicos, cuando se eligen en función de los algoritmos utilizados. Se seleccionaron los péptidos específicos que se predijo que serían más antigénicos según los algoritmos EMBOSS y Open Biosystems, y también se demostró que eran específicos para EMMPRIN mediante el uso de búsquedas de homología Blast (que indican la calidad de la coincidencia entre dos secuencias). Además, se utilizaron péptidos que fueron tan homólogos a la secuencia humana como fue posible; sin embargo, debido a la baja homología entre el ratón y las secuencias humanas (aproximadamente el 65%), cada péptido sintetizado tenía al menos 3 aminoácidos diferentes. Estos péptidos tampoco fueron homólogos a ninguna proteína de ratón, incluidos los otros dos miembros de la familia EMMPRIN, Neuoplastina o Embigin. En base a todas estas consideraciones, fue casi imposible encontrar secuencias peptídicas dentro del dominio EC-II, y solo dos de esas secuencias podrían ubicarse dentro del dominio EC-I, mientras que el resto de los péptidos se ubicaron en el dominio distal que es único a la larga isoforma EMMPRIN. Los ocho péptidos diferentes diseminados a lo largo de los dominios extracelulares de

EMMPRIN, EC-0, EC-I y EC-II, también denominados D-0, DI y D-II como se describe en Belton RJ, en el., Ibid, que se seleccionaron para las síntesis se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1:** Péptidos utilizados para generar anticuerpos policlonales.

Nº de Péptido	Longitud	Región Extracelular Extra	Puntuación de blasto
156	14aa	EC-0	43,5
157	15aa	EC-0	50,3
158	13aa	EC-0	39,7
159	20aa	EC-0	59,2
160	21aa	EC-I	76,8
161	12aa	EC-I	50,5
162	11aa	EC-II	40,1
163	16aa	EC-I	51,1

**[0182]** Se sintetizaron péptidos, usando métodos convencionales en fase sólida, conjugados con el vehículo KLH, y cada conjugado se inyectó en dos conejos. Se recogieron sueros preinmunes e inmunes, y el título de cada anticuerpo se determinó cualitativamente mediante ELISA (Figura 1). Los altos títulos observados para todos los anticuerpos y la falta de respuesta a BSA indican que los anticuerpos generados fueron específicos para sus respectivos péptidos inmunizantes y que los sueros inmunes contenían anticuerpos en concentraciones relativamente altas. Sin embargo, como los anticuerpos podían reconocer epítomos lineales basados en su secuencia primaria o epítomos conformacionales basados en su estructura espacial, no reconocían necesariamente la proteína EMMPRIN de longitud completa. La capacidad de cada uno de los ocho sueros inmunitarios para unirse a EMMPRIN se evaluó mediante análisis de inmunotransferencia y ELISA indirecto. Las inmunotransferencias utilizaron mrEMMPRIN desnaturalizado como antígeno, y cada uno de los 8 anticuerpos (o sus sueros preinmunes) se probó agregándolo como un anticuerpo primario, seguido de incubación con una IgG anti-conejo secundaria conjugada con HRP. Solo dos anticuerpos, designados nº 157 y nº 161, reconocieron específicamente mrEMMPRIN utilizando el suero inmune, pero no el suero preinmune (Figura 2), lo que indica que estos anticuerpos pueden reconocer la secuencia primaria de la proteína EMMPRIN desnaturalizada.

**[0183]** La especificidad y la capacidad de los anticuerpos para reconocer mrEMMPRIN en su estructura nativa también se probaron mediante ELISA indirecto, usando mrEMMPRIN (200 ng/ml) o proteína IgG Fc humana (hFc, 200 ng/ml) para recubrir placas de 96 pocillos. Cada pocillo se sonó con suero inmune o preinmune de cada uno de los anticuerpos policlonales por duplicado ( $n = 4$ ), y los valores de OD se restaron del fondo de la respuesta a la proteína Fc. Los valores de  $p$  se calcularon mediante la prueba de  $t$  de Mann-Whitney. \*\*,  $p < 0,01$ , relativo a sueros preinmunes. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Especificidad de los anticuerpos contra EMMPRIN, determinada por ELISA indirecto

Nº de anticuerpo	Suero inmune	Suero preinmune	Valor P
156	0,0052 ± 0,0082	0,040 ± 0,034	0,3053 (ns)
157	0,033±0,02	0,048±0,016	0,8857 (ns)
158	0,0013±0,004	0,028±0,02	0,2683 (ns)
159	0,004±0,01	0,007±0,05	0,981 (ns)
160	0,004±0,005	0,008±0,003	0,8000 (ns)
161	0,052±0,026	0,008±0,0087	0,0260 **
162	0,0030±0,0085	0,0040±0,0030	0,5333 (ns)
163	0,0015±0,019	0,050±0,029	0,2454 (ns)

**[0184]** Dado que mrEMMPRIN es una proteína quimérica compuesta por la porción extracelular de EMMPRIN fusionada con la porción Fc de la IgG humana, la proteína Fc humana se usó como control negativo para la resta de su valor de OD. El anticuerpo nº 161, generado contra un péptido que tiene la secuencia GHRWMRGKVL (SEQ ID NO.: 1) del dominio EC-I de EMMPRIN de ratón, fue el único que mostró especificidad del suero del anticuerpo a mrEMMPRIN (por 4,9 veces en relación a sueros preinmunes,  $p < 0,01$ ). Reconoce mrEMMPRIN tanto en la conformación desnaturalizada como en la nativa, y es probable que realmente reconozca la proteína en sistemas *in vitro* e *in vivo*.

**Ejemplo 2. Una plataforma de selección *in vitro* que utiliza co-cultivos de células tumorales y macrófagos para detectar anticuerpos con la capacidad de inhibir la secreción de VEGF y MMP-9:**

**[0185]** Entre las muchas actividades de EMMPRIN, la capacidad de inducir MMP-9 y VEGF, que son mediadores cruciales de la angiogénesis y el crecimiento tumoral, se eligió como un parámetro de actividad. Para establecer una plataforma *in vitro* para detectar los efectos inhibitorios de los anticuerpos, se realizó una búsqueda de condiciones que desencadenan una secreción elevada de MMP-9 y VEGF.

**[0186]** En primer lugar, se establecieron condiciones *in vitro* en las que la expresión de EMMPRIN, MMP-9 y VEGF fue máxima, o al menos marcadamente estimulada. Los experimentos preliminares indicaron que las células tenían que incubarse durante al menos 48 h para observar los cambios en los niveles de acumulación de MMP-9 y VEGF secretados, y por lo tanto este punto de tiempo se usó en los siguientes experimentos. Se incubaron cultivos individuales de células tumorales o macrófagos o ambos tipos de células en cocultivos durante 48 h, se recogieron los sobrenadantes para la determinación de las concentraciones de VEGF y MMP-9 secretadas, y las células se recogieron para la determinación de la expresión de EMMPRIN en la superficie. La viabilidad celular se monitorizó rutinariamente en todos los cultivos, pero se mantuvo sin cambios durante la duración del experimento.

**[0187]** La expresión de EMMPRIN asociada a la membrana, estimada por citometría de flujo (Figura 3 y 4), aumentó en ambos co-cultivos de células CT26 o RENCA con macrófagos RAW 264,7 en relación con cada uno de los cultivos individuales (aproximadamente 2 veces, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Sin embargo, los co-cultivos no afectaron significativamente la cantidad de EMMPRIN expresada en la superficie celular (como se indica por ningún cambio en la fluorescencia media), y solo se observó un aumento o disminución menor en la expresión general de EMMPRIN en la superficie en ambos tipos de células. Cuando se utilizaron los macrófagos provocados por TG, los cocultivos mostraron una reducción de 2 veces en la expresión de EMMPRIN en la superficie con respecto a cada cultivo individual ( $p < 0,05$ ). Las células TRAMP-C2 expresaron cantidades relativamente altas de EMMPRIN de superficie, y la incubación en co-cultivo con RAW 264,7 o macrófagos provocados por TG lo redujo en 1,4 y 1,8 veces, respectivamente ( $p < 0,01$ ).

**[0188]** Los efectos del co-cultivo en la secreción de MMP-9 y VEGF también fueron ensayados. Las figuras 3 y 4 muestran que todas las líneas de células tumorales incubadas en cultivos individuales solo secretaron niveles mínimos de MMP-9 (1.598±456 pg/ml para CT26, 1.232±684 pg/ml para RENCA, y 354±117 pg/ml para TRAMP C2). De manera similar, los macrófagos provocados por TG o las células RAW 264,7 incubadas en cultivos individuales en normoxia también secretaron solo cantidades mínimas de MMP-9 (153±153 pg/ml para TG-elicitado y 3.000±456 pg/ml para RAW 264,7). La incubación de cada una de las líneas de células tumorales con RAW 264,7 o con los macrófagos provocados por TG en co-cultivos en normoxia sinérgicamente aumentó significativamente la secreción de MMP-9 en células CT26 ( $p < 0,001$ ), en 12 - y 32 veces, respectivamente para RENCA ( $p < 0,001$ ), y aproximadamente 8 veces para las células TRAMP-C2 ( $p < 0,001$ ) en relación con cada uno de los cultivos individuales de macrófagos, y más en relación con los cultivos de células tumorales individuales.

**[0189]** A diferencia de MMP-9, VEGF se expresó constitutivamente en todas las líneas celulares pero no en los macrófagos provocados por TG. La expresión de VEGF en cada una de las células tumorales fue moderada en normoxia (9,166±963 pg/ml para CT26, 3,122±614 pg/ml para RENCA, 9,894±998 pg/ml para TRAMP-C2, y 5,887±897 pg/ml para los macrófagos RAW 264,7), pero en los macrófagos provocados por TG la concentración de VEGF fue relativamente baja (616±598 pg/ml). Sin embargo, el co-cultivo de cada una de las células tumorales con RAW 264,7 o con los macrófagos TG provocados elevó significativamente las cantidades acumuladas de VEGF en el medio de 2 a 5 veces en relación con cada una de las células tumorales y con los cultivos individuales RAW 264,7 ( $p < 0,01$ ), y por 15-22 veces en relación con los cultivos individuales de macrófagos inducidos por TG ( $p < 0,01$ ).

### **Ejemplo 3. Selección de los anticuerpos policlonales para efectos inhibitorios sobre MMP-9 y VEGF utilizando sistemas de cultivo en ratones *in vitro* y en humanos:**

**[0190]** La configuración de co-cultivo descrita previamente generó altas cantidades de VEGF y MMP-9 secretados. Por lo tanto, estas condiciones se usaron para detectar anticuerpos que pueden inhibir la inducción mediada por EMMPRIN de VEGF y/o MMP-9. Los sueros inmunes y preinmunes de cada uno de los ocho anticuerpos se diluyeron (diluciones seriadas 5 veces) y se incubaron junto con cocultivos de células tumorales CT26 o TRAMP-C2 con macrófagos RAW 264,7 durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes y las concentraciones de VEGF y MMP-9 se evaluaron mediante ELISA. Siete de los ocho anticuerpos mediaron ningún cambio significativo en la concentración de MMP-9 o VEGF entre los sueros inmunes y preinmunes en las diferentes diluciones, y también en comparación con los co-cultivos solos (sin la adición del inmune o sueros preinmunes). Solo el anticuerpo policlonal nº 161 redujo la expresión de VEGF y MMP-9 en algunas de las diluciones probadas, tanto en los co-cultivos de TRAMP-C2 como de CT26 (Figura 5). En los co-cultivos macrófagos-TRAMP-C2 y macrófagos-CT26, el anticuerpo redujo la MMP-9 en hasta un 61% en dilución 1:62.500 ( $p < 0,01$ ), y en un 64% en dilución 1:312,500 ( $p < 0,01$ ), respectivamente, en relación con el suero preinmune. De manera similar, las concentraciones de VEGF en estos co-cultivos se redujeron en 29% y 33%, respectivamente ( $p < 0,05$ ), en dilución 1:1.565.500, en relación con el suero preinmune.

**[0191]** El anticuerpo nº 161 se generó contra un péptido de ratón que tiene solo 3 aminoácidos diferentes en comparación con el péptido humano, y por lo tanto podría mostrar cierta reactividad cruzada en la unión y en los efectos en el cultivo. Para evaluar la capacidad del anticuerpo nº 161 para reaccionar de forma cruzada con la

EMMPRIN humana, se usó un sistema humano similar con dos líneas celulares tumorales, la línea celular de cáncer renal humano (A498) y la línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) que fueron co-cultivados con una línea celular humana similar a monocitos (U937). Las diluciones que anteriormente funcionaban en el sistema del ratón (1:312.500 y 1:1.562.500), se utilizaron y los cocultivos se incubaron con estas concentraciones del anticuerpo nº 161 (Figura 6). Usando estas dos diluciones en relación con el suero preinmune, las concentraciones de MMP-9 se redujeron en ambos co-cultivos después de 48 horas de incubación con el suero inmune en un 28% ( $p < 0,01$ ) y en un 21% ( $p < 0,05$ ) para los co-cultivos A498, y en un 71% y en un 61% ( $p < 0,05$ ) para los co-cultivos MCF-7. De manera similar, las concentraciones de VEGF después de la incubación con el suero inmune se redujeron en la dilución más alta con respecto al suero preinmune en un 15% ( $p < 0,05$ ) en el co-cultivo de A498 y en las dos diluciones en un 18% ( $p < 0,001$ ) y 8% ( $p < 0,05$ ), respectivamente, en los co-cultivos de MCF-7.

#### **Ejemplo 4. El anticuerpo policlonal anti-EMMPRIN nº 161 inhibe el crecimiento del tumor *in vivo*:**

**[0192]** La capacidad del anticuerpo policlonal nº 161 para reducir el crecimiento y la progresión del tumor se ensayó en dos modelos diferentes de cáncer. Muchos estudios que utilizan la terapia de inmunización pasiva en modelos animales inmunizan rutinariamente ratones antes de la administración de las células tumorales relevantes (Hu et al. Cancer Biol Ther. 2007; 6:1773-1779). Por lo tanto, los anticuerpos que existen en la circulación pueden combatir los tumores en etapas muy tempranas, cuando el sistema inmunológico aún no suprime el sistema inmunitario (la fase de eliminación del proceso de inmunoección). En contraste, la estimulación se ensayó en el escenario de la vida real humana, administrando la primera inyección de anticuerpo después de que el tumor ya era palpable. En tales etapas posteriores, el tumor ya ha desarrollado un microambiente que suprime una respuesta inmune y ayuda a las células tumorales a escapar de la detección inmune. Otro estudio también usó un mAb anti-EMMPRIN (con un epítipo desconocido) durante las etapas posteriores de la progresión del tumor en ratones SCID con tumores de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello humanos, y en combinación con radioterapia *in vivo* y mostró un retraso significativo en la progresión del tumor (Dean et al., Clin Cancer Res. 2009; 15: 4058-4065).

**[0193]** Los ratones Balb/C se inyectaron primero con las líneas celulares RENCA o CT26, para generar tumores subcutáneos pequeños (aproximadamente 2 mm x 2 mm), pero palpables el día 13 (para RENCA) y el día 15 (para CT26). En estos puntos de tiempo, el anticuerpo purificado por afinidad nº 161 se inyectó ip a diferentes concentraciones (25 µg/2 µl, 50 µg/2 µl y 100 µg/2 µl), con refuerzos adicionales cada 7 días. Se inyectó como control solución salina sin anticuerpo o anticuerpo nº 162 que no inhibió MMP-9 o VEGF en las pruebas de detección *in vitro*. El crecimiento del tumor se controló cada 3-4 días y se calcularon los volúmenes. En ambos ratones inyectados con RENCA y CT26, el anticuerpo inhibió el crecimiento del tumor más extensamente con la dosis más baja de 25 µg. En los tumores RENCA, el crecimiento fue inhibido por 2,2, 3,4 y 158 veces, respectivamente, y en los tumores CT26 por 1,7, 2,0 y 4 veces, alcanzando significación estadística ( $p < 0,05$ ) en ambos tipos de tumores para dosis baja en comparación con el grupo de control de solución salina en el último día del experimento (Figura 7).

#### **Ejemplo 5. Síntesis del péptido nº 161 como multímero (161-MAP)**

**[0194]** La síntesis de un conjugado MAP octa-ramificado se realizó manualmente mediante un procedimiento en fase sólida paso a paso en resina Fmoc-Beta-Ala-Wang en la que están presentes 0,05 mmol de Beta-Ala en 0,5 g de resina. La síntesis del primer y cada nivel subsiguiente del núcleo portador se logró utilizando un exceso de 3 molar de Fmoc-Lys (Fmoc) (0,2, 0,4, 0,8 y 1,6 mmol consecutivamente) en dimetilformamida (DMF) (HCONMe<sub>2</sub>, 12 ml/g de resina) seguido de un segundo acoplamiento a través de HBTU en DMF para dar, después de la desprotección, la matriz MAP octacifundada que contiene ocho grupos amino funcionales. Los grupos protectores para la síntesis de los antígenos peptídicos fueron grupos Fmoc para los terminales alfa-amino y derivados de tBu para la mayoría de los aminoácidos de cadena lateral. Las reacciones de acoplamiento se controlaron mediante una prueba cuantitativa de ninhidrina. El proceso de desprotección se inició mediante la eliminación del grupo protector Fmoc con 20% de piperidin en DMF durante 15 min. El péptido ramificado oligo-lisina se eliminó del soporte de resina de poliestireno reticulado con la escisión del método TFA para producir el MAP bruto (85-93% de rendimiento de escisión). El péptido en bruto se lavó luego con éter frío y se liofilizó y se purificó por tandas mediante una permeación en gel de alto rendimiento.

#### **Ejemplo 6. La inmunización activa con el péptido ramificado inhibe la progresión del tumor *in vivo* y desencadena la memoria inmunológica:**

**[0195]** Un conjugado MAP del péptido nº 161 (denotado 161-MAP) es un péptido octa-ramificado en el que ocho copias de la secuencia peptídica se conjugan a una matriz central de 8 residuos de lisina. Se espera que este constructo tenga una mayor estabilidad e inmunogenicidad, por lo que ya no se necesita la conjugación con una proteína transportadora (Pini et al., Curr Protein Pept Sci. 2008; 9: 468-477). Además, la nueva conformación del MAP lo convierte en un neo-antígeno que es capaz de romper la tolerancia inmune a pesar de la secuencia propia (Renaudet et al. PLoS One. 2010; 5: e11216).

**[0196]** Los ratones Balb/C se inyectaron primero con las líneas celulares RENCA o CT26, y después de 7 días recibieron su primera inyección del 161-MAP en CFA, seguido de dos inyecciones de refuerzo en IFA cada 7 días. El

161-MAP se inyectó en tres concentraciones (10 µg/30 µl, 25 µg/30 µl y 50 µg/30 µl) en la almohadilla del pie. El grupo adyuvante de control recibió inyecciones con CFA e IFA sin 161-MAP. El crecimiento del tumor se controló cada 3-4 días. En ambos tumores, RENCA y CT26, 161-MAP inhibió el crecimiento de una manera dependiente de la dosis. En general, la respuesta en ratones inyectados con CT26 fue mejor. La dependencia de la dosis alcanzó significación estadística para los grupos de 25 y 50 mg solo en ratones inyectados con células tumorales CT26 (p <0,001 después de 22 y 26 días en relación con el grupo de control adyuvante), y aunque la tendencia fue similar con los tumores RENCA, no alcanzó significación estadística (Figura 8B y A). En algunos de los ratones inyectados con células tumorales CT26 (p. ej., todos los ratones del grupo que recibió 50 mg de 161-MAP), la inmunización causó la regresión completa de los tumores que ya eran palpables (Figura 9). Los ratones demostraron una inflamación temporal (almohadillas hinchadas y rojas) que pasaron después de 3-4 semanas.

**[0197]** El 161-MAP actuó de una manera dependiente de la dosis, y la dosis peptídica más alta (50 mg) inhibió el crecimiento del tumor RENCA en aproximadamente un 50%. En el modelo de tumor CT26, la dosis baja de péptido dio como resultado una inhibición del 50% del crecimiento del tumor, mientras que la dosis alta resultó en una regresión completa de los tumores en todos los ratones analizados. Sin embargo, algunos de los ratones tratados incluso con esta dosis baja mostraron una regresión completa de los tumores (Figura 9). Además, todos los ratones con tumores regresivos, independientemente de la dosis de péptido ramificado inyectada, se volvieron a inyectar con células tumorales, pero no se detectaron tumores (Figura 10), en comparación con los ratones de control en los que se detectaron tumores.

**[0198]** A diferencia de la inmunización pasiva que ya está establecida para el tratamiento del cáncer, la inmunización activa se ha ensayado con poca frecuencia como una estrategia para la inmunoterapia del cáncer, a pesar del beneficio inherente de establecer la memoria inmunológica. Para examinar si el proceso de inmunización de ratones contra EMMPRIN con 161-MAP desencadena la memoria inmunológica, se utilizaron los ratones que sobrevivieron y regresaron a sus tumores. Tres semanas después de la regresión completa, los ratones continuaron demostrando una buena salud sin efectos secundarios. Los ratones fueron inyectados con  $2 \times 10^6$  células tumorales CT26 por segunda vez. Aunque este procedimiento fue suficiente para aumentar los tumores subcutáneos en ratones de control después de la primera inyección, no se desarrollaron tumores en ninguno de los ratones que sobrevivieron después de la inmunización con 161-MAP. En comparación, los ratones que recibieron inyecciones de CFA e IFA en la almohadilla del pie 3 veces cada 7 días antes de recibir la inyección de células tumorales CT26 (adyuvante), se utilizaron como control, y todos estos ratones de control produjeron tumores palpables dentro de los 18 días (Figura 10).

**[0199]** Este descubrimiento sugiere fuertemente que 161-MAP MAP tuvo éxito en la activación de una respuesta inmune y generó memoria inmunológica, lo que implica que la vacunación de ratones portadores de tumores con la secuencia MAP podría prevenir la recurrencia del tumor.

**[0200]** Esto se confirma aún más detectando (mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica usando marcadores de proteínas específicas) infiltrantes de neutrófilos, subpoblaciones de macrófagos específicos, células NK, células T y/o células B en los tumores, demostrando centros germinales activos en los bazo de ratones inmunizados, y demostrando la presencia de anticuerpos anti-EMMPRIN en sus sueros, usando ELISA indirecto.

**[0201]** A pesar de las múltiples funciones atribuidas a la proteína EMMPRIN, no se detectaron cambios fisiológicos o adversos adversos en el bienestar de los ratones que recibieron el péptido ramificado, incluso después de casi dos meses. Muchas de las funciones de EMMPRIN son cruciales durante las etapas de desarrollo, y es posible que las funciones de adulto de EMMPRIN sean más cruciales en el contexto del tumor en comparación con el tejido normal, lo que sugiere por qué no se observaron reacciones adversas. Además, los epítomos diferentes de los utilizados para la vacunación pueden ser relevantes para las funciones fisiológicas y de desarrollo de EMMPRIN.

## **Ejemplo 7: Modelo de tratamiento**

**[0202]** Se inocularon por vía subcutánea ratones Balb/C hembra de 8 semanas de edad en el flanco con  $2 \times 10^6$  células CT26 (en el día 0), y 161-MAP a concentraciones de 10 µg, 25 µg o 50 µg disueltas en 30 µl de CFA (0,4, Se inyectaron 1 y 2 mg/kg de peso corporal el día 7 en la almohadilla de la pata, seguidos de dos inyecciones de refuerzo adicionales en IFA cada 7 días. Los ratones que sobrevivieron y mostraron una regresión completa de tumores previamente palpables (Figura 9) se inocularon en su flanco con otro desafío de  $2 \times 10^6$  células CT26 (segundo tratamiento), 6 semanas después del final del primer experimento (primer tratamiento). Los 14 ratones sobrevivieron y ninguno desarrolló un tumor. Un ratón murió después de 3,5 meses, antes de recibir el tercer tratamiento, pero no se encontró ningún tumor en su flanco ni en sus órganos internos. Los 13 ratones restantes se sometieron a un tercer tratamiento, repitiendo el protocolo exacto como para el segundo tratamiento, 6 meses después del final del primer experimento (primer tratamiento). Nuevamente, los 13 ratones que fueron inyectados con el tercer tratamiento sobrevivieron y ninguno desarrolló un tumor (Tabla 3). Como antes, los ratones de control recibieron inyecciones de CFA e IFA en la almohadilla del pie 3 veces cada 7 días antes de recibir la inyección de células tumorales CT26 (adyuvante).] Finalmente, 4 de los 13 ratones fueron elegidos al azar después del tratamiento-3 e inyectados con  $1 \times 10^6$  CT26 células en la vena de la cola (iv) para generar metástasis en el pulmón (Tabla 3). Tres de los ratones no tenían metástasis pulmonares y solo uno desarrolló 43 focos metastásicos, en

comparación con un promedio de 324 metástasis desarrolladas en un ratón de 11 meses de edad que recibió el péptido revuelto. En consecuencia, como se muestra en la Figura 11, las metástasis aumentaron el peso del pulmón (promedio de 0,572 gr en los grupos de control), y la falta de metástasis en los ratones tratados con 161-MAP resultó en un peso de los pulmones similar al de los ratones sanos (promedio de 0,144 gr).

**Tabla 3:** 161-MAP previene la recurrencia tumoral

Nº de Tratamiento	Time of challenge	Vía	Resultado	Nº de ratones
1 <sup>er</sup> Tratamiento	0	inyección s.c.	Sin tumores	14
2º Tratamiento	Después de 1,5 meses	inyección s.c.	Sin tumores	14
3 <sup>er</sup> Tratamiento	Después de 6 meses	inyección s.c.	Sin tumores	13
4º Tratamiento	Después de 11 meses	inyección i.v.	Sin metastasis en 3 de 4 ratones	4

### Ejemplo 8: Modelos metastásicos

**[0203]** Las líneas de células tumorales CT26 (colon) y RENCA (renal) no generan espontáneamente metástasis del tumor primario generado por inyecciones de sc en el flanco. Sin embargo, tras las inyecciones de las células en la vena de la cola (iv), estas células migran a los pulmones y generan tumores pequeños, que simulan metástasis pulmonares. Esto se ha convertido en un modelo aceptado para metástasis (Weng YL, Mol Nutr Food Res. 2010 Feb; 54 (2): 259-67; Chang KH, et al, Am J Chin Med. 2004; 32 (6): 863-72; Lee YJ, et al, caner Res. 2010 70; 8357; Shanker A et al, JNCI J Natl Cancer Inst (2008) 100 (9): 649-662)).

**[0204]** Se inmunizaron ratones Balb/C hembras de 8 semanas de edad mediante 3 inyecciones de refuerzo cada 7 días usando concentraciones crecientes de 161-MAP o el MAP de control revuelto. Siete días después de la última inyección de refuerzo, los ratones recibieron una inyección en la vena de la cola de las células CT26 o RENCA (1 x 10<sup>6</sup> en 200 µl de PBS). Después de 14-16 días (para los ratones inyectados con CT26) o después de 21-23 días (para los ratones inyectados con RENCA), los ratones se sacrificaron y los nódulos tumorales en la superficie de los pulmones se contaron bajo un microscopio de disección. Se eliminaron los pulmones, se secaron sobre un papel secante y se pesaron (Figura 12).

**[0205] Resultados:** Los ratones de control que recibieron el MAP revuelto desarrollaron metástasis pulmonares (en promedio: 230 metástasis en ratones CT26, 214 metástasis en ratones RENCA) (Figura 12B y 12E), y en consecuencia su peso pulmonar se incrementó en 3,5-4 veces relativo a los ratones sanos sin inyecciones de células cancerosas (0,675 gr en ratones RENCA, 0,649 gr en ratones CT26) (Figura 12C y 12F). El 161-MAP tuvo éxito casi por completo en la prevención de metástasis pulmonares en ratones RENCA en todas las dosis utilizadas, mientras que se observó una clara dosis-respuesta para el modelo CT26. De manera similar, el peso pulmonar de los ratones que recibieron el 161-MAP fue cercano al de los ratones sanos en todas las dosis utilizadas para el modelo RENCA, mientras que el CT26 demostró una clara dosis-respuesta. En las Figuras 12A y 12D se muestran imágenes representativas de pulmones de ratones inyectados con células CT26 o RENCA y que reciben 50 µg del MAP revuelto o 75 µg de 161-MAP.

**[0206]** El modelo en el que se administra 161-MAP antes de que las células metastásicas realmente imite el escenario de la vida real, donde un tumor primario se trata con cirugía o quimioterapia antes de que las células metastásicas residuales ingresen a la circulación. Por lo tanto, la vacuna 161-MAP podría reducir con éxito e incluso prevenir dramáticamente la formación de metástasis pulmonares y, por lo tanto, podría usarse como terapia adyuvante diseñada para prevenir la recurrencia del tumor en pacientes con tumores primarios tratados convencionalmente.

### Ejemplo 9: Análogos peptídicos de la secuencia peptídica 161

**[0207]** Los análogos de péptidos de la secuencia nº 161 se sintetizan y verifican, solos, conjugados a moléculas portadoras y/o en formato MAP, para determinar la actividad y la inmunogenicidad. Una lista no limitante de dichos análogos incluye las secuencias en la tabla 4, Los anticuerpos generados contra estas secuencias también se analizan para determinar su actividad en los modelos *in vitro* e *in vivo* descritos anteriormente.

Tabla 4. Análogos de péptidos del péptido nº 161

	Secuencia de ratón	Secuencia humana
5	Original GHRWMRGGKVLC (SEQ ID NO.: 1)	GHRWLKGGVLC (SEQ ID NO.: 2)
	Extendido TCSLNSSGVDIVGHRWMRGGKVL Q (SEQ ID NO.: 16)	TCSLNDSA TEVTGHRWLKGGVVLK (SEQ ID NO.: 17)
	SGVDIVGHRWMRGGKVLQ (SEQ ID NO.: 18)	SATEVTGHRWLKGGWLK (SEQ ID NO.: 19)
10	Análogos GHRFMRGGKVL (SEQ ID NO.: 20)	GHRFLKGGVVL (SEQ ID NO.: 21)
	GLRWMRGGKVL (SEQ ID NO.: 22)	GLRWLKGGVVL (SEQ ID NO.: 23)
	GHRWLRGGKVL (SEQ ID NO.: 24)	GHRWLRGGVVL (SEQ ID NO.: 25)
	GHRWMKGGKVL (SEQ ID NO.: 26)	GHRWMKGGVVL (SEQ ID NO.: 27)
	GHRWMRCGKVL (SEQ ID NO.: 28)	GHRWLKCGVVL (SEQ ID NO.: 29)
15	GHRWMRGAKVL (SEQ ID NO.: 30)	GHRWLKGAWL (SEQ ID NO.: 31)
	GHRWMRGGVVL (SEQ ID NO.: 32)	GHRWLKGGKVL (SEQ ID NO.: 33)
	Fragmentos GHRWMRG (SEQ ID NO.: 34)	GHRWLKG (SEQ ID NO.: 35)
	HRWMRGG (SEQ ID NO.: 36)	HRWLKGG (SEQ ID NO.: 37)
20	RWMRGGK (SEQ ID NO.: 38)	RWLKGGV (SEQ ID NO.: 39)
	WMRGGKV (SEQ ID NO.: 40)	WLKGGVV (SEQ ID NO.: 41)

LISTADO DE SECUENCIAS

[0208]

<110> RAPPAPORT FAMILY INSTITUTE FOR RESEARCH IN THE MEDICAL SCIENCES MOR RESEARCH APPLICATIONS LTD.

<120> PEPTIDOS DE INDUCTOR DE METALOPROTEINASA DE MATRIZ EXTRACELULAR (EMMPRIN) Y ANTICUERPOS DE UNIÓN

<130> RAP/005/PCT

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Péptido sintético

<400> 1

Gly His Arg Trp Met Arg Gly Gly Lys Val Leu Cys  
1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Péptido sintético

<400> 2

Gly His Arg Trp Leu Lys Gly Gly Val Val Leu Cys  
1 5 10

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Péptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 5 <223> Xaa es Met o Leu  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 10 <223> Xaa es Arg o Lys  
  
 <400> 3  
  
 15 Gly His Arg Trp Xaa Xaa  
 1 5  
  
 <210> 4  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 20 <213> Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 25 <223> Xaa es Met o Leu  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 30 <223> Xaa es Arg o Lys  
  
 <400> 4  
  
 35 His Arg Trp Xaa Xaa Gly  
 1 5  
  
 <210> 5  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 40 <213> Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 45 <223> Xaa es Met o Leu  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 50 <223> Xaa es Arg o Lys  
  
 <400> 5  
  
 55 Arg Trp Xaa Xaa Gly Gly  
 1 5  
  
 <210> 6  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 60 <213> Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 65 <223> Xaa es Met o Leu

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 5 <223> Xaa es Arg o Lys  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 10 <223> Xaa es Lys o Val  
  
 <400> 6  
  
 15                   Trp Xaa Xaa Gly Gly Xaa  
                       1                                   5  
  
 <210> 7  
 <211> 6  
 20 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 25 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es Met o Leu  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 30 <222> (2).. (2)  
 <223> Xaa es Arg o Lys  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 35 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa es Lys o Val  
  
 <400> 7  
  
 40                   Xaa Xaa Gly Gly Xaa Val  
                       1                                   5  
  
 <210> 8  
 45 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético  
  
 <220>  
 50 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es Arg o Lys  
  
 <220>  
 55 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es Lys o Val  
  
 <400> 8  
  
 60                   Xaa Gly Gly Xaa Val Leu  
                       1                                   5  
  
 65 <210> 9

ES 2 702 278 T3

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa es Met o Leu

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa es Arg o Lys

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa es Lys o Val

20 <400> 9

Gly His Arg Trp Xaa Xaa Gly Gly Xaa Val Leu  
 1 5 10

25

<210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético

30 <400> 10

35

Gly His Arg Trp Met Arg Gly Gly Lys Val Leu  
 1 5 10

40

<210> 11  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético

45 <400> 11

Gly His Arg Trp Leu Lys Gly Gly Val Val Leu  
 1 5 10

50

<210> 12  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa es Met o Leu

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa es Arg o Lys

65

ES 2 702 278 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa es Lys o Val  
 5  
 <400> 12  
  
 Gly His Arg Trp Xaa Xaa Gly Gly Xaa Val Leu Cys  
 10  
 1 5 10  
  
 15 <210> 13  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa es Met o Leu  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa es Arg o Lys  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa es Lys o Val  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa es Cys o Lys  
 40 <400> 13  
  
 Gly His Arg Trp Xaa Xaa Gly Gly Xaa Val Leu Xaa  
 45 1 5 10  
  
 <210> 14  
 <211> 12  
 50 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 55 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa es Cys o Lys  
  
 <400> 14  
 60  
 Gly His Arg Trp Met Arg Gly Gly Lys Val Leu Xaa  
 1 5 10  
  
 <210> 15  
 65 <211> 12

ES 2 702 278 T3

<212> PRT  
 <213> Péptido sintético

<220>  
 5 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa es Cys o Lys

<400> 15

10

Gly His Arg Trp Leu Lys Gly Gly Val Val Leu Xaa  
 1 5 10

15

<210> 16  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 20 <213> Péptido sintético

<400> 16

25

Thr Cys Ser Leu Asn Ser Ser Gly Val Asp Ile Val Gly His Arg Trp  
 1 5 10 15

Met Arg Gly Gly Lys Val Leu Gln  
 20

30

<210> 17  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 35 <213> Péptido sintético

<400> 17

40

Thr Cys Ser Leu Asn Asp Ser Ala Thr Glu Val Thr Gly His Arg Trp  
 1 5 10 15

Leu Lys Gly Gly Val Val Leu Lys  
 20

45

<210> 18  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético

50

<400> 18

55

Ser Gly Val Asp Ile Val Gly His Arg Trp Met Arg Gly Gly Lys Val  
 1 5 10 15

Leu Gln

60

<210> 19  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético

<400> 19

65

# ES 2 702 278 T3

		Ser Ala Thr Glu Val Thr Gly His Arg Trp Leu Lys Gly Gly Val Val			
	1		5	10	15
5		Leu Lys			
		<210> 20			
		<211> 11			
		<212> PRT			
10		<213> Péptido sintético			
		<400> 20			
15		Gly His Arg Phe Met Arg Gly Gly Lys Val Leu			
	1		5	10	
		<210> 21			
		<211> 11			
20		<212> PRT			
		<213> Péptido sintético			
		<400> 21			
25		Gly His Arg Phe Leu Lys Gly Gly Val Val Leu			
	1		5	10	
		<210> 22			
30		<211> 11			
		<212> PRT			
		<213> Péptido sintético			
		<400> 22			
35		Gly Leu Arg Trp Met Arg Gly Gly Lys Val Leu			
	1		5	10	
40		<210> 23			
		<211> 11			
		<212> PRT			
		<213> Péptido sintético			
45		<400> 23			
50		Gly Leu Arg Trp Leu Lys Gly Gly Val Val Leu			
	1		5	10	
		<210> 24			
		<211> 11			
		<212> PRT			
		<213> Péptido sintético			
55		<400> 24			
60		Gly His Arg Trp Leu Arg Gly Gly Lys Val Leu			
	1		5	10	
		<210> 25			
		<211> 11			
65					

<212> PRT  
<213> Péptido sintético

5 <400> 25

10 Gly His Arg Trp Leu Arg Gly Gly Val Val Leu  
1 5 10

<210> 26  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Péptido sintético

15 <400> 26

20 Gly His Arg Trp Met Lys Gly Gly Lys Val Leu  
1 5 10

<210> 27  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Péptido sintético

25 <400> 27

30 Gly His Arg Trp Met Lys Gly Gly Val Val Leu  
1 5 10

<210> 28  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Péptido sintético

35 <400> 28

40 Gly His Arg Trp Met Arg Cys Gly Lys Val Leu  
1 5 10

<210> 29  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Péptido sintético

45 <400> 29

50 Gly His Arg Trp Leu Lys Cys Gly Val Val Leu  
1 5 10

<210> 30  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Péptido sintético

55 <400> 30

60

65

ES 2 702 278 T3

5 Gly His Arg Trp Met Arg Gly Ala Lys Val Leu  
1 5 10

<210> 31  
<211> 11  
10 <212> PRT  
<213> Péptido sintético

<400> 31

15 Gly His Arg Trp Leu Lys Gly Ala Val Val Leu  
1 5 10

20 <210> 32  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Péptido sintético

25 <400> 32

30 Gly His Arg Trp Met Arg Gly Gly Val Val Leu  
1 5 10

35 <210> 33  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Péptido sintético

40 <400> 33

45 Gly His Arg Trp Leu Lys Gly Gly Lys Val Leu  
1 5 10

50 <210> 34  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Péptido sintético

<400> 34

55 Gly His Arg Trp Met Arg Gly  
1 5

60 <210> 35  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Péptido sintético

65 <400> 35

Gly His Arg Trp Leu Lys Gly  
 1 5  
 5  
 <210> 36  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 10 <213> Péptido sintético  
 <400> 36  
 15  
 His Arg Trp Met Arg Gly Gly  
 1 5  
 20  
 <210> 37  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético  
 25  
 <400> 37  
 30  
 His Arg Trp Leu Lys Gly Gly  
 1 5  
 <210> 38  
 <211> 7  
 35 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético  
 <400> 38  
 40  
 Arg Trp Met Arg Gly Gly Lys  
 1 5  
 45 <210> 39  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético  
 50 <400> 39  
 55  
 Arg Trp Leu Lys Gly Gly Val  
 1 5  
 <210> 40  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 60 <213> Péptido sintético  
 <400> 40  
 65

5 Trp Met Arg Gly Gly Lys Val  
 1 5

<210> 41  
 <211> 7  
 10 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético

<400> 41

15 Trp Leu Lys Gly Gly Val Val  
 1 5

20 <210> 42  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es Cys o Lys

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa es Met o Leu

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa es Arg o Lys

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa es Lys o Val

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa es Cys o Lys

50 <400> 42

55 Xaa Gly His Arg Trp Xaa Xaa Gly Gly Xaa Val Leu Xaa  
 1 5 10

60 <210> 43  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Péptido sintético

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE

ES 2 702 278 T3

<222> (1)..(1)  
<223> Xaa es Cys o Lys

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa es Met o Leu

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa es Arg o Lys

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(10)  
<223> Xaa es Lys o Val

20 <400> 43

Xaa Gly His Arg Trp Xaa Xaa Gly Gly Xaa Val Leu  
1 5 10

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido aislado de hasta 25 aminoácidos, que comprende una secuencia como se establece:

GHRWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>GGX<sub>3</sub>VLX<sub>4</sub> (SEQ ID NO.: 13)

en donde X<sub>1</sub> es seleccionado de Met y Leu, X<sub>2</sub> es seleccionado de Arg y Lys, X<sub>3</sub> es seleccionado de Lys y Val, X<sub>4</sub> es Cys o Lys.

2. El péptido aislado según la reivindicación 1,

que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: X<sub>5</sub>GHRWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>GGX<sub>3</sub>VLX<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 42);

en donde X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> se seleccionan como anteriormente, y X<sub>5</sub> es Cys o Lys; o en donde el péptido comprende la secuencia

GHRWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>GGX<sub>3</sub>VLC (SEQ ID NO.: 12);

en donde X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> son como se definen anteriormente;

o

que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

GHRWMRGGKVLX<sub>4</sub> (SEQ ID NO.: 14); y

GHRWLKGGVVLX<sub>4</sub> (SEQ ID NO.: 15)

en donde X<sub>4</sub> es Cys o Lys.

3. Una proteína de fusión que comprende al menos un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

4. Un multímero peptídico, que comprende una pluralidad de péptidos idénticos o diferentes según la reivindicación 1 o 2, en el que dichos péptidos están unidos covalentemente.

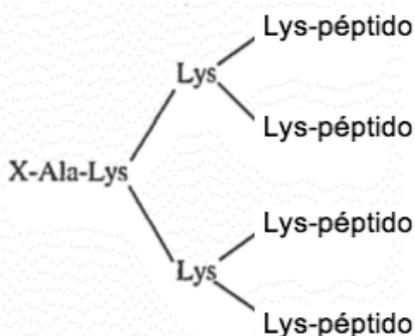
5. El multímero peptídico según la reivindicación 4,

que comprende un enlazador que comprende 3-12 residuos de lisina; o

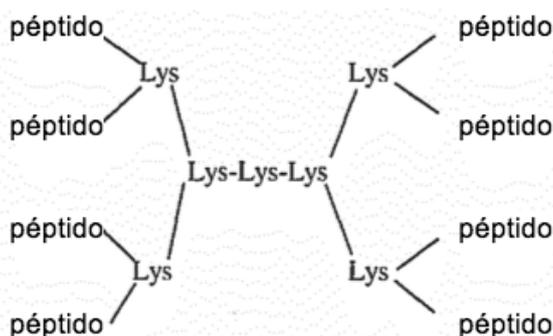
que comprende 2-16 péptidos diferentes o idénticos; o

que comprende al menos un péptido seleccionado de una secuencia establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 12-15; o

en donde el péptido multímero es una molécula de acuerdo con la Fórmula II o III:



**Formula II**



**Formula III**

en donde X es el C-terminal del péptido seleccionado de ácido carboxi, grupo amida o alcohol, y "péptido" es un péptido aislado según la reivindicación 1 o 2.

5 **6.** Una secuencia de polinucleótido aislada que comprende una secuencia que codifica al menos un péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

**7.** Un vector que comprende al menos una secuencia polinucleotídica de acuerdo con la reivindicación 6, que codifica además una proteína portadora.

10 **8.** Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende al menos una porción de unión a antígeno, en el que dicho anticuerpo reconoce un epítoto de al menos seis aminoácidos contiguos de una secuencia expuesta en la reivindicación 1.

15 **9.** El fragmento de anticuerpo o anticuerpo según la reivindicación 8, en donde el anticuerpo reconoce un determinante antigénico que comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO.: 5, 6, 7, o 8 dentro de la secuencia:

G-H-R-W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G-G-X<sub>3</sub>-V-L (SEQ ID NO.: 9)

en donde X<sub>1</sub> es seleccionado de Met y Leu, X<sub>2</sub> es seleccionado de Arg y Lys, y X<sub>3</sub> es seleccionado de Lys y Val;

o

20 en donde el anticuerpo reconoce un determinante antigénico que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO.: 5, 6, 7, o 8 dentro de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

G-H-R-W-M-R-G-G-K-V-L-C (SEQ ID NO.: 1);

G-H-R-W-M-R-G-G-K-V-L (SEQ ID NO.: 10); y

25 G-H-R-W-L-K-G-G-V-V-L (SEQ ID NO.: 11);

o

en donde el anticuerpo reconoce un determinante antigénico dentro de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

30 G-H-R-W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub> (SEQ ID NO.: 3);

H-R-W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G (SEQ ID NO.: 4);

R-W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G-G (SEQ ID NO.: 5);

W-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G-G-X<sub>3</sub> (SEQ ID NO.: 6);

35 X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-G-G-X<sub>3</sub>-V (SEQ ID NO.: 7);

X<sub>2</sub>-G-G-X<sub>3</sub>-V-L (SEQ ID NO.: 8);

en donde X<sub>1</sub> es seleccionado de Met y Leu, X<sub>2</sub> es seleccionado de Arg y Lys, y X<sub>3</sub> es seleccionado de Lys y Val; o

40 en el que el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que comprende al menos la porción de unión a antígeno.

**10.** Una secuencia de polinucleótidos que codifica un fragmento de anticuerpo o anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8.

45 **11.** Un vector que comprende al menos una secuencia de polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 10.

**12.** Una composición farmacéutica que comprende

50 (i) al menos un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, al menos una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 6, o al menos un vector de acuerdo con la reivindicación 7, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; o

(ii) al menos un multímero peptídico según la reivindicación 4 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; o

55 (iii) al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además un excipiente o diluyente.

**13.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 (i) o (ii), formulada como una composición de vacuna, para uso en la inducción de una respuesta inmune contra EMMPRIN en un sujeto.

60 **14.** Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, para uso en la prevención, atenuación o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de EMMPRIN, en donde la enfermedad o trastorno asociado con la expresión de EMMPRIN es una enfermedad de proliferación celular o un trastorno, una enfermedad inflamatoria o un trastorno, una enfermedad autoinmune o un trastorno, una enfermedad cardíaca o trastorno como la insuficiencia cardíaca, una enfermedad regenerativa de tejidos o trastorno, o una enfermedad relacionada con la angiogénesis o trastorno; o

65 para uso en el tratamiento del cáncer, prevenir o inhibir el desarrollo de metástasis o tratar la metástasis tumoral;

aumentar la duración de la supervivencia o aumentar la supervivencia libre de progresión o aumentar la duración de la respuesta de un sujeto que tiene cáncer; o prevenir la recurrencia del tumor.

**15.** Un método para detectar o cuantificar la presencia de EMMPRIN que comprende los pasos de:

- 5
- i. incubar una muestra con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la misma según la reivindicación 8 o 9;
  - ii. detectar el EMMPRIN enlazado usando una sonda detectable.  
preferiblemente que además comprende,
  - iii. comparar la cantidad de (ii) a una curva estándar obtenida de una muestra de referencia que contiene una  
10 cantidad conocida de EMMPRIN; y
  - iv. calcular la cantidad de EMMPRIN en la muestra de la curva estándar.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Dilución	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1:500														
1:2,500														
1:12,250														
1:62,500														
1:312,500														
1:1.56x10 <sup>6</sup>														
Anticuerpo	156		157		158		159		160		161		162	163

FIGURA 1

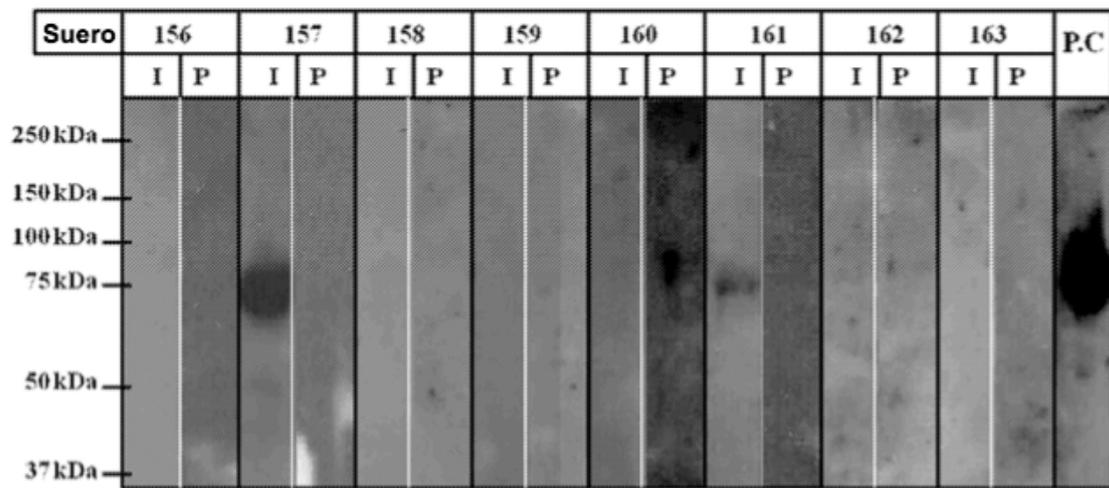


FIGURA 2

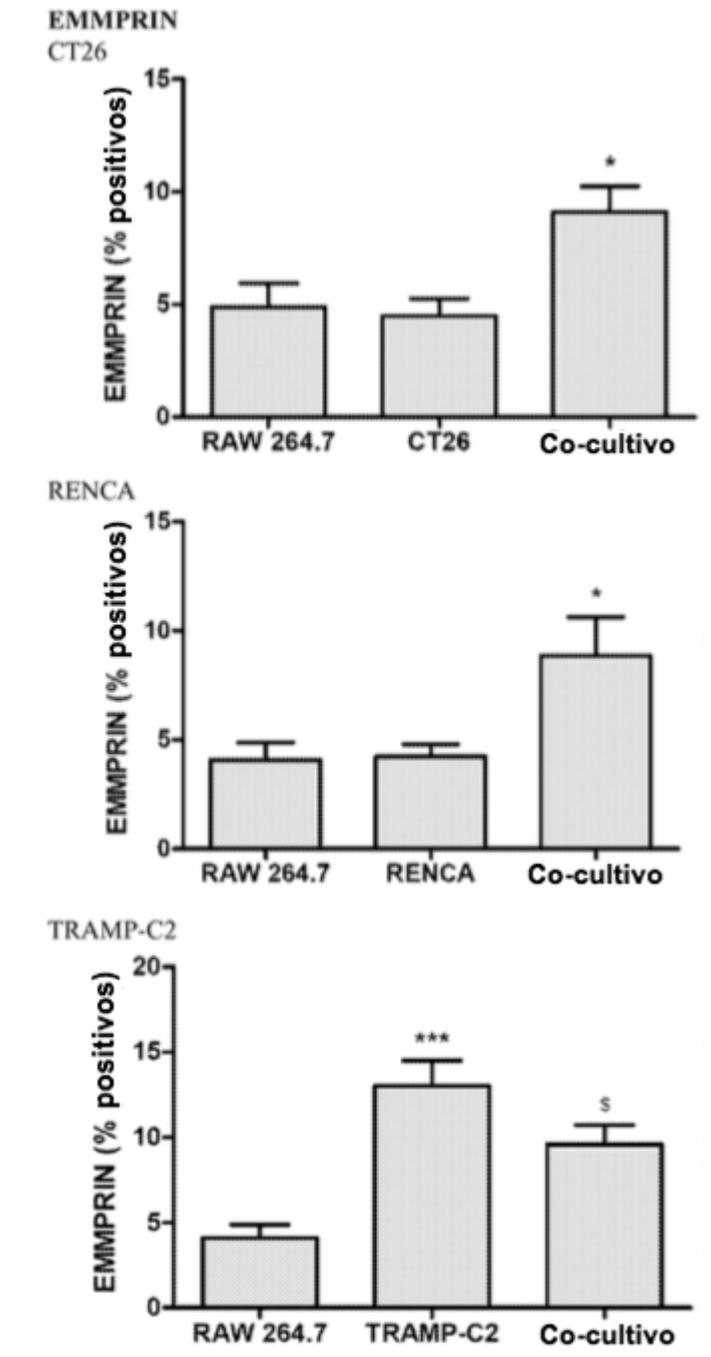


FIGURA 3A

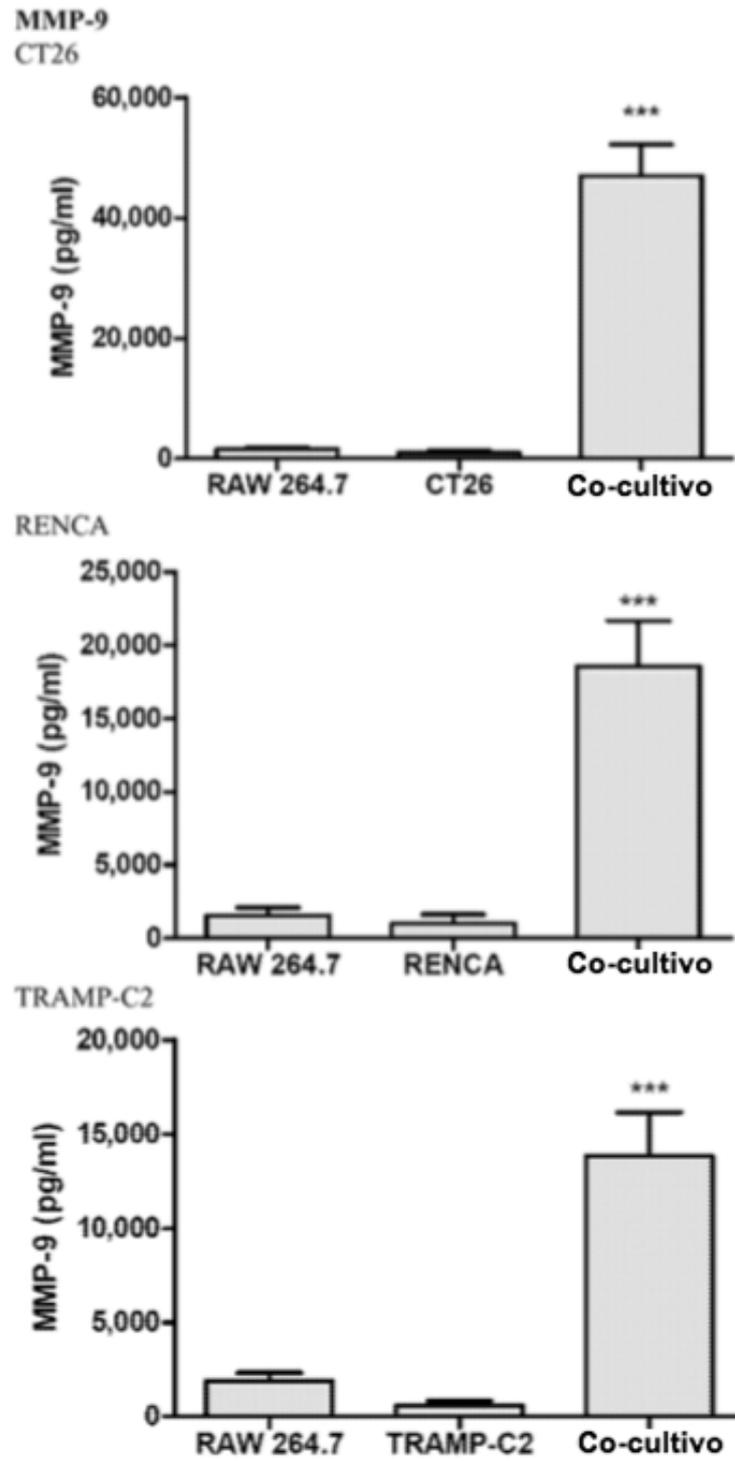


FIGURA 3B

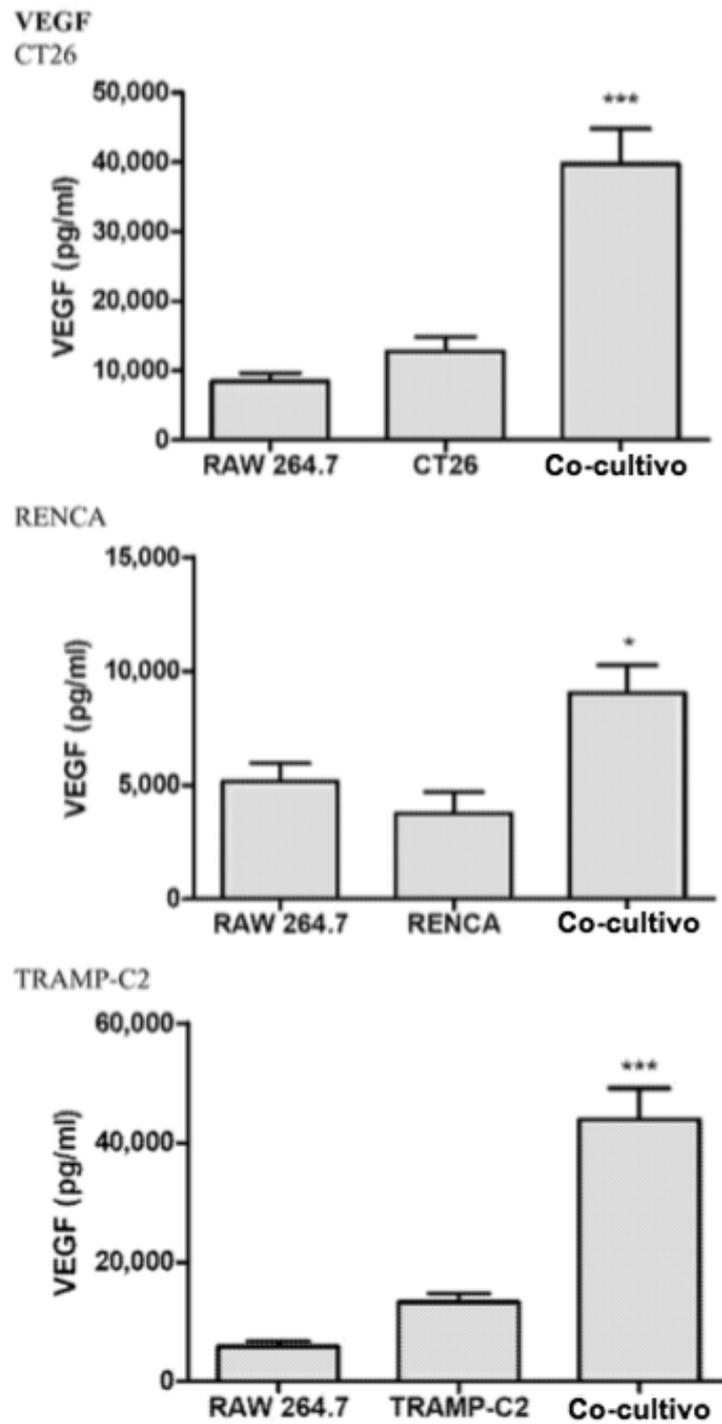


FIGURA 3C

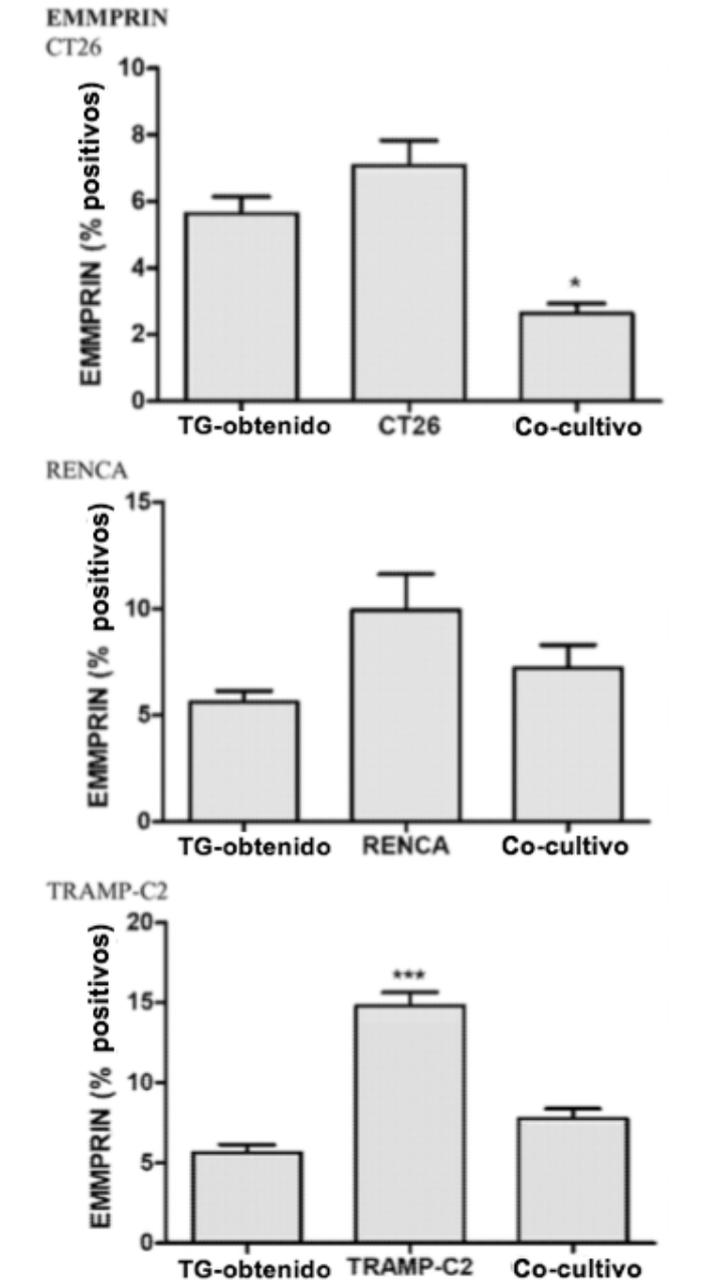


FIGURA 4A

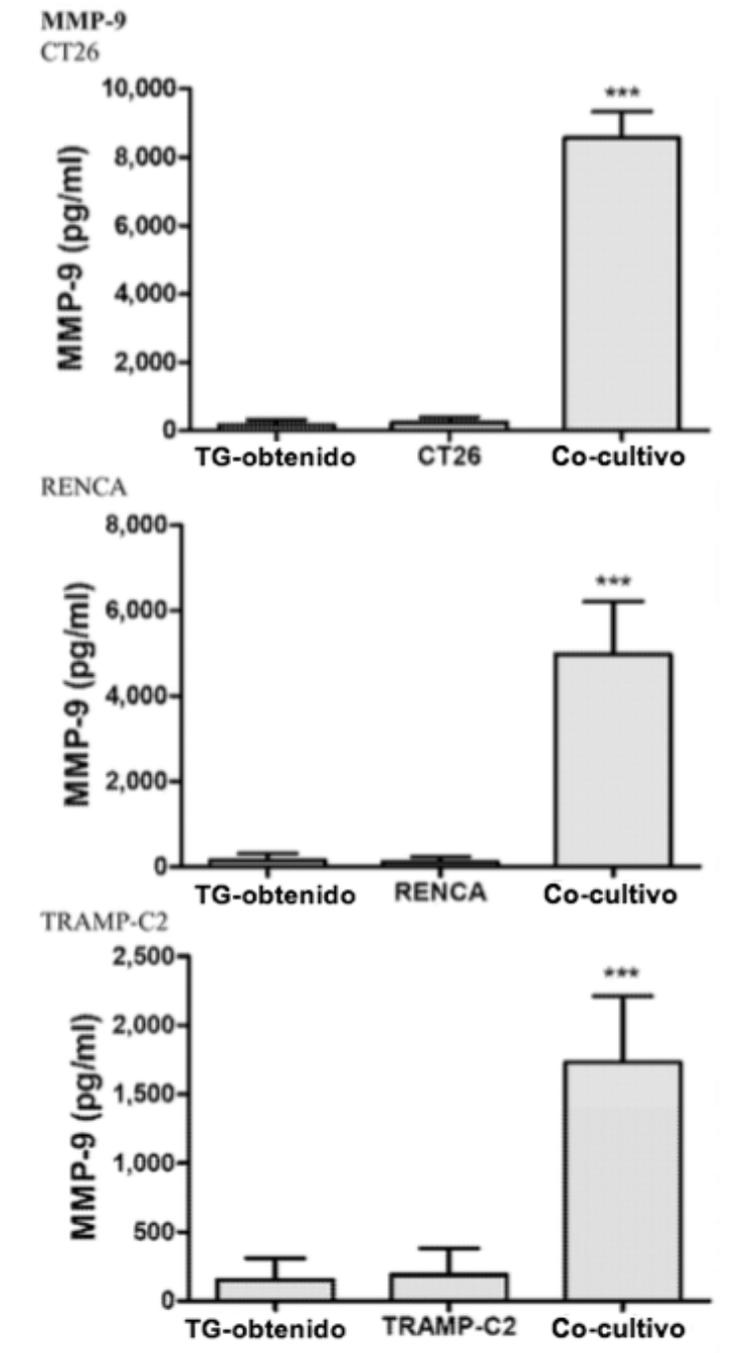


FIGURA 4B

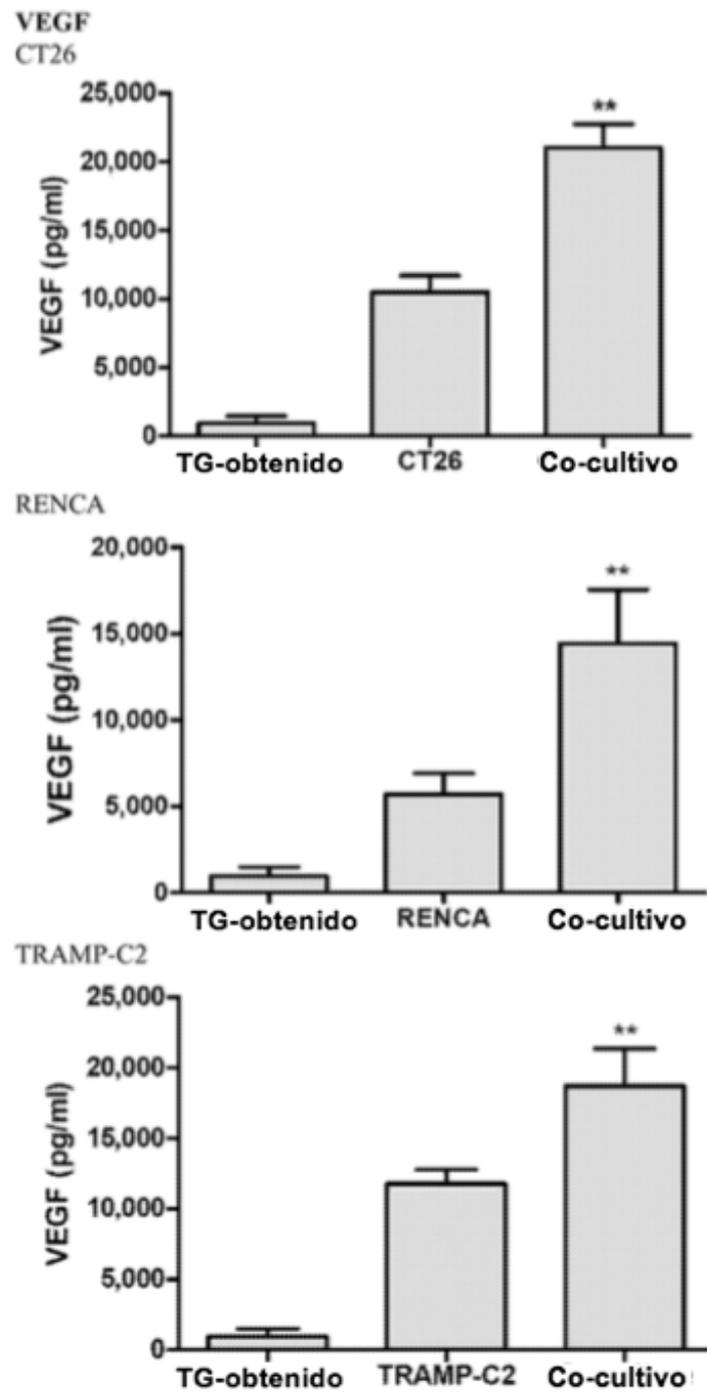
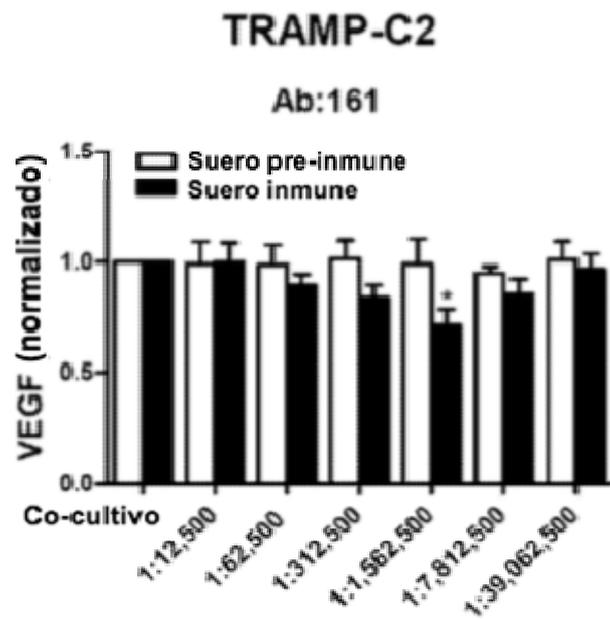
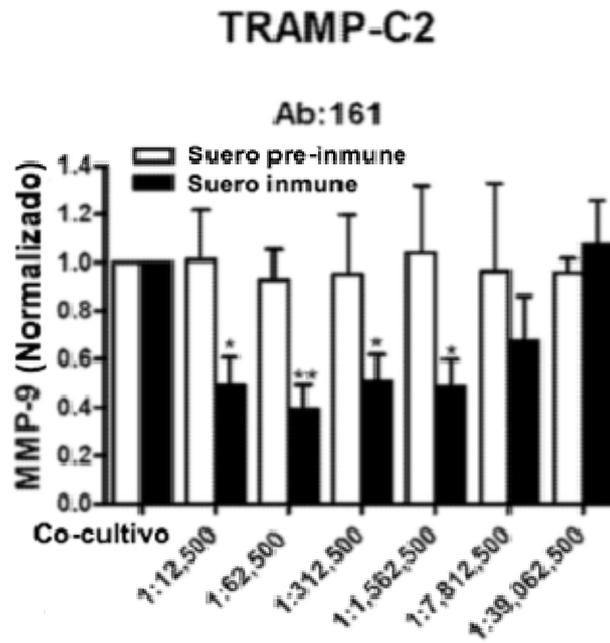
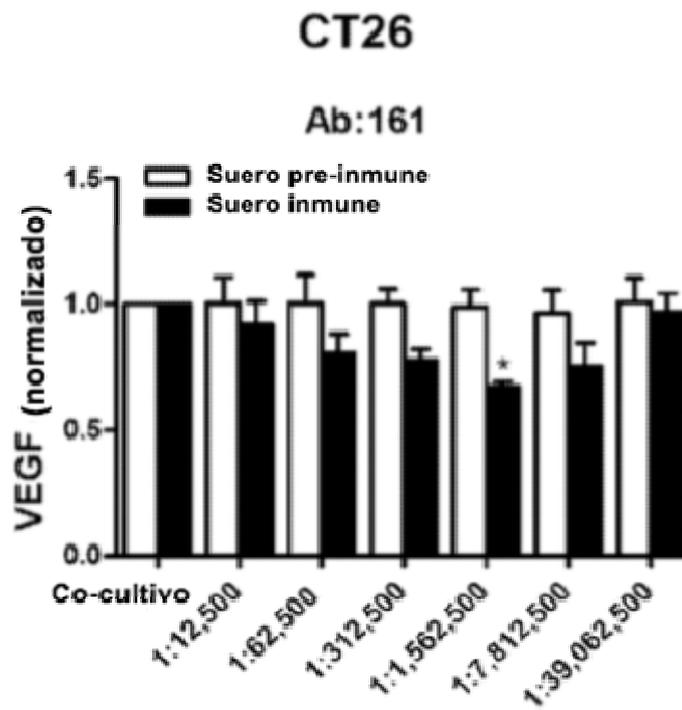
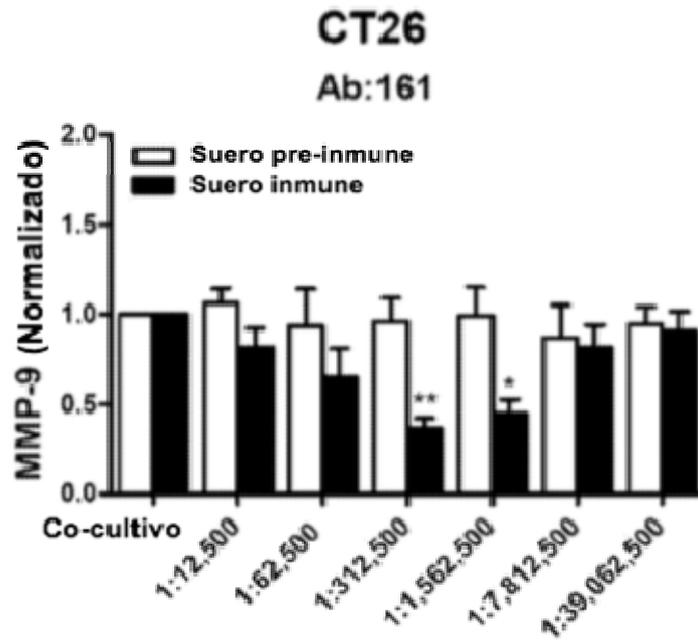


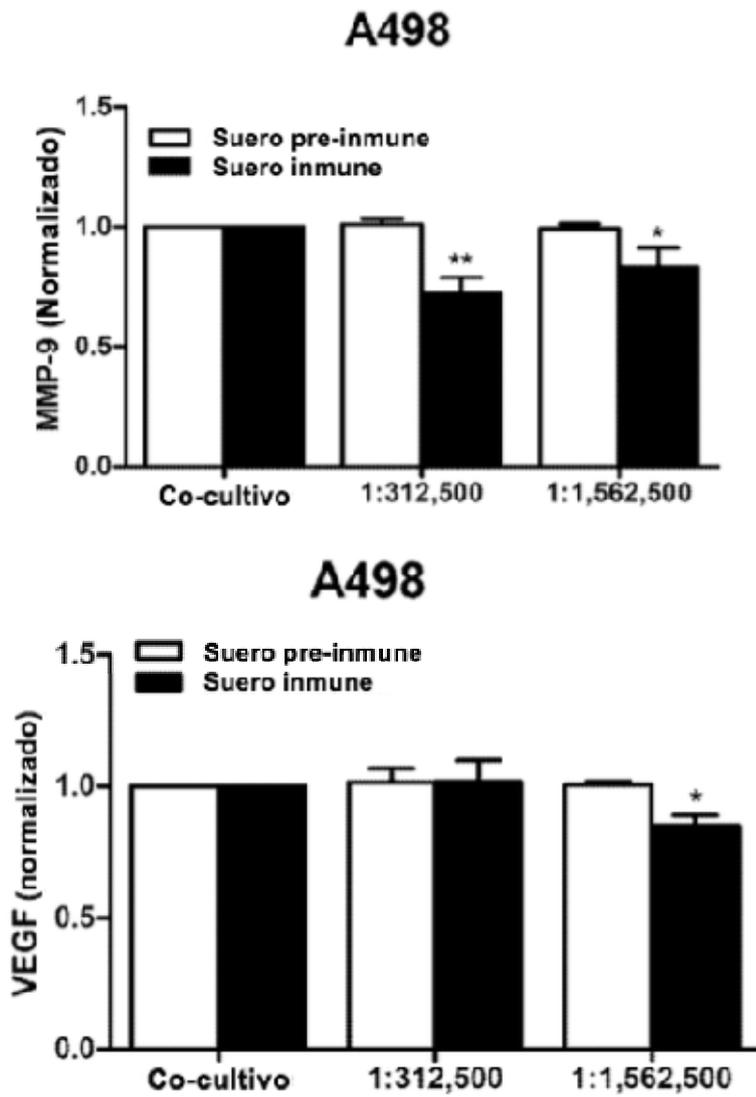
FIGURA 4C



**FIGURA 5A**



**FIGURA 5B**



**FIGURA 6A**

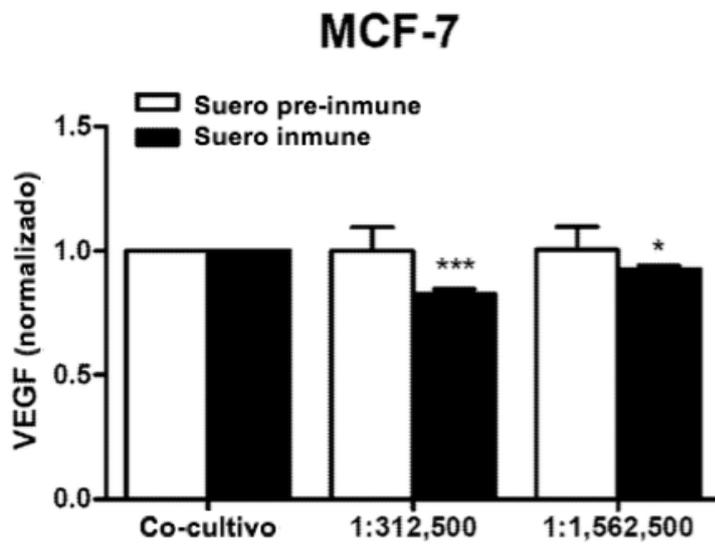
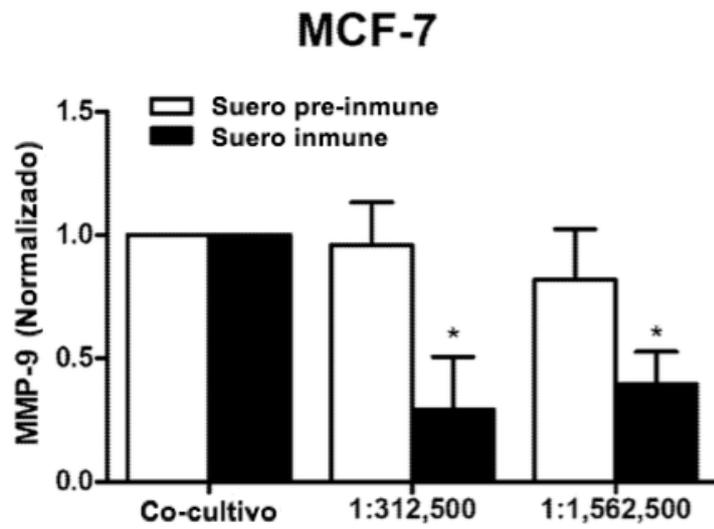


FIGURA 6B

## RENCA

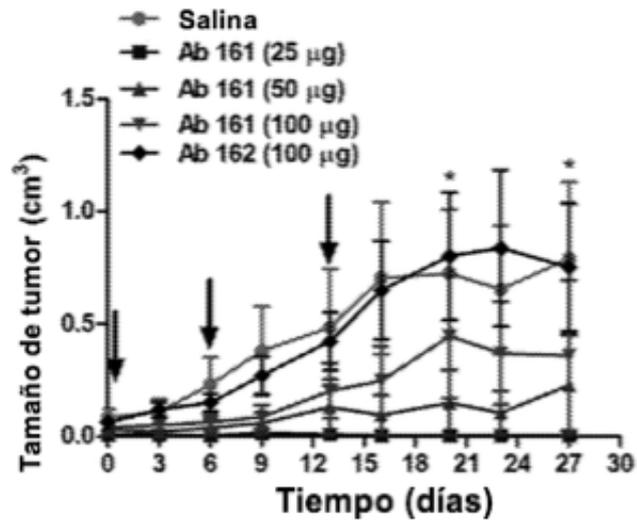


FIGURA 7A

## CT26

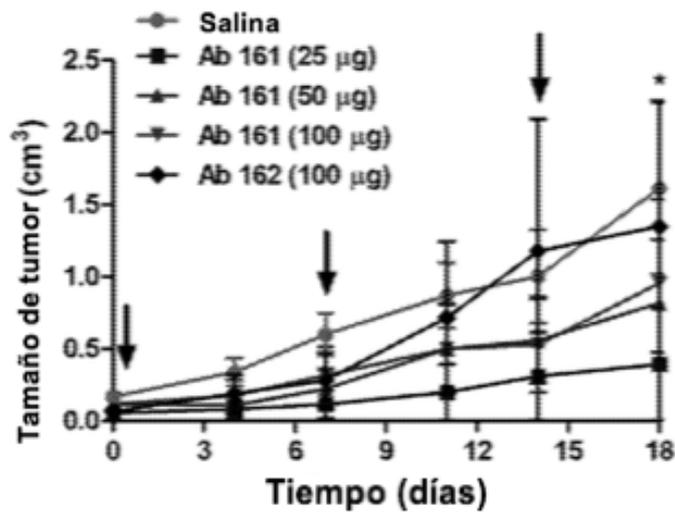


FIGURA 7B

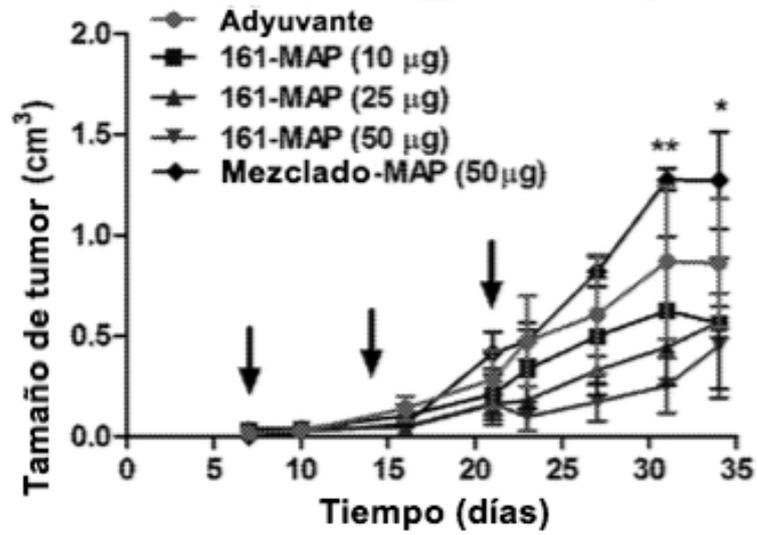


FIGURA 8A

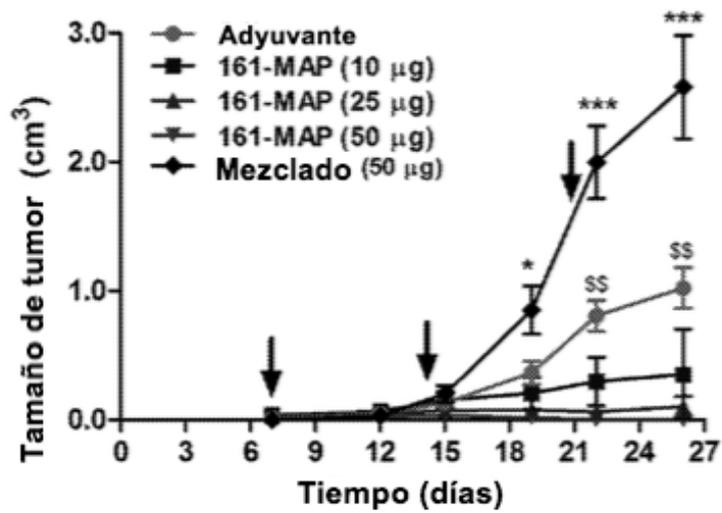


FIGURA 8B

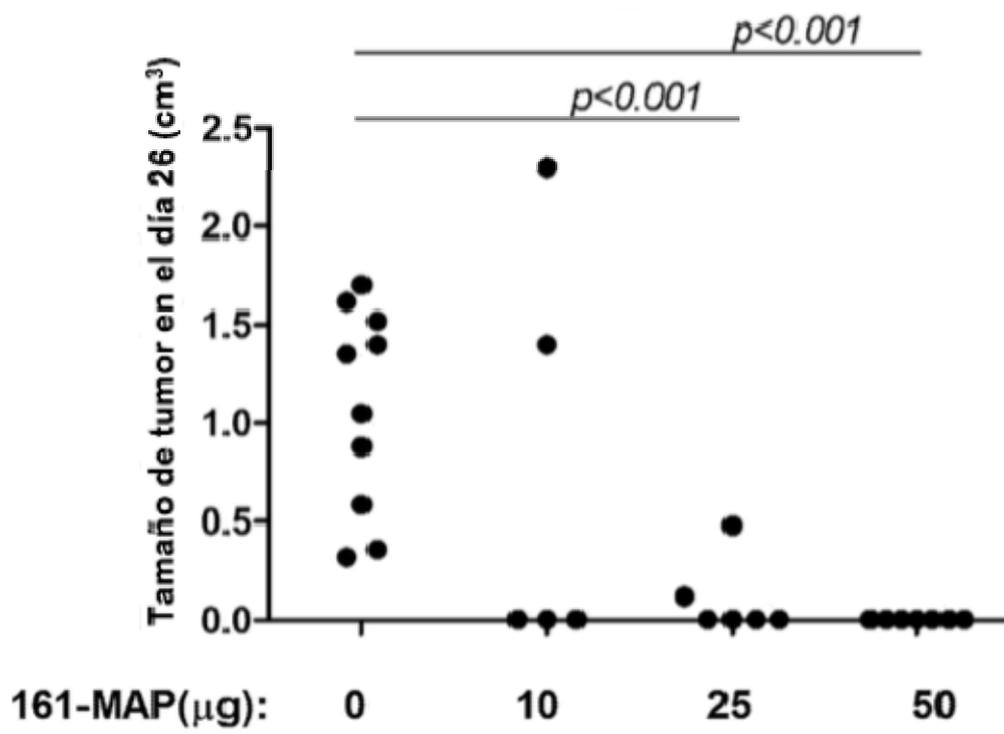


FIGURA 9

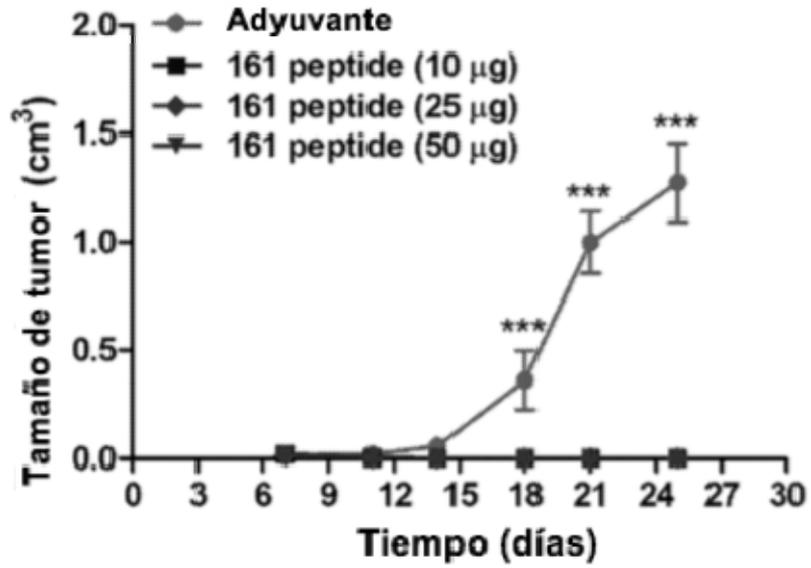


FIGURA 10

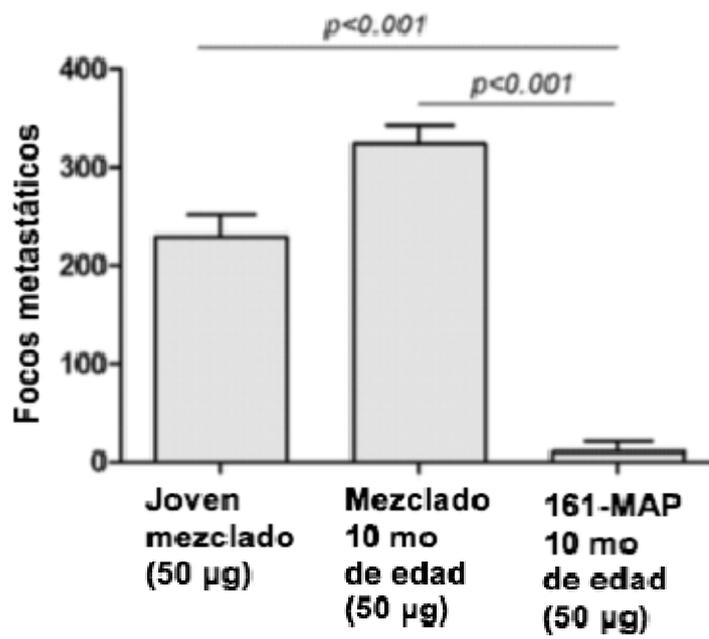


FIGURA 11A

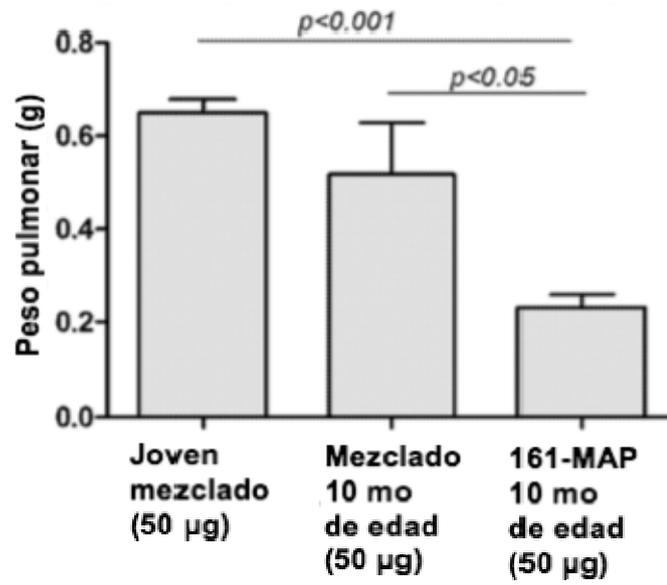
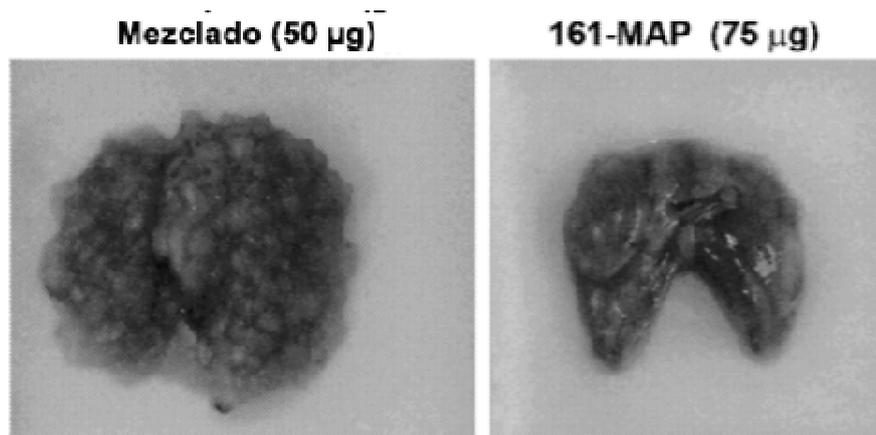


FIGURA 11B



**FIGURA 12A**

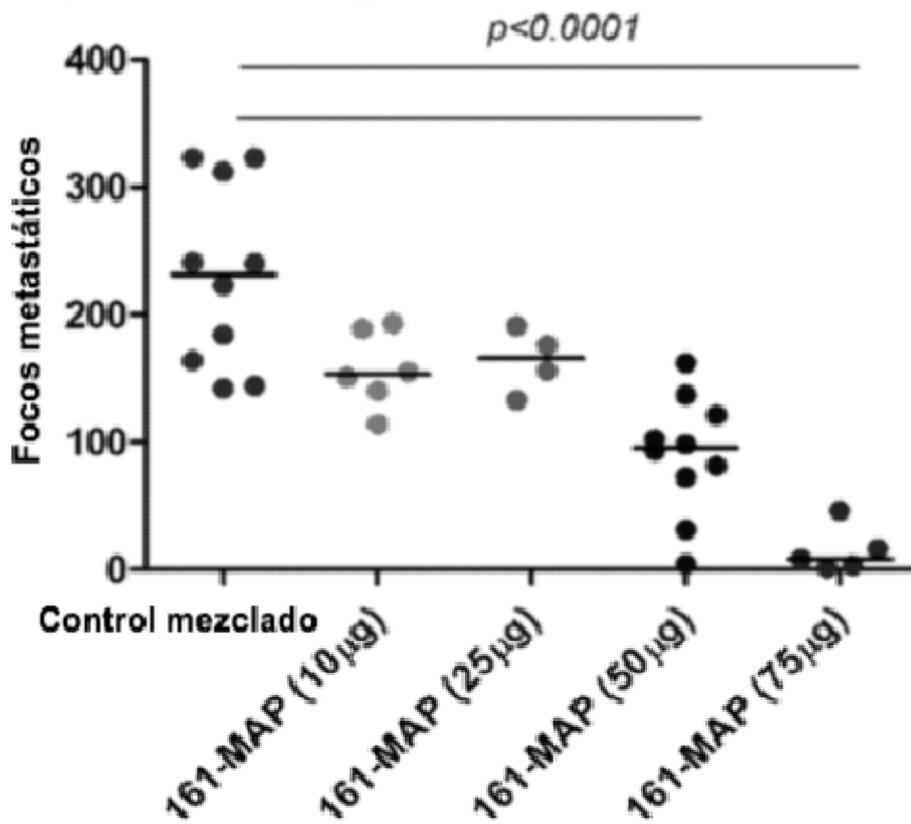


FIGURA 12B

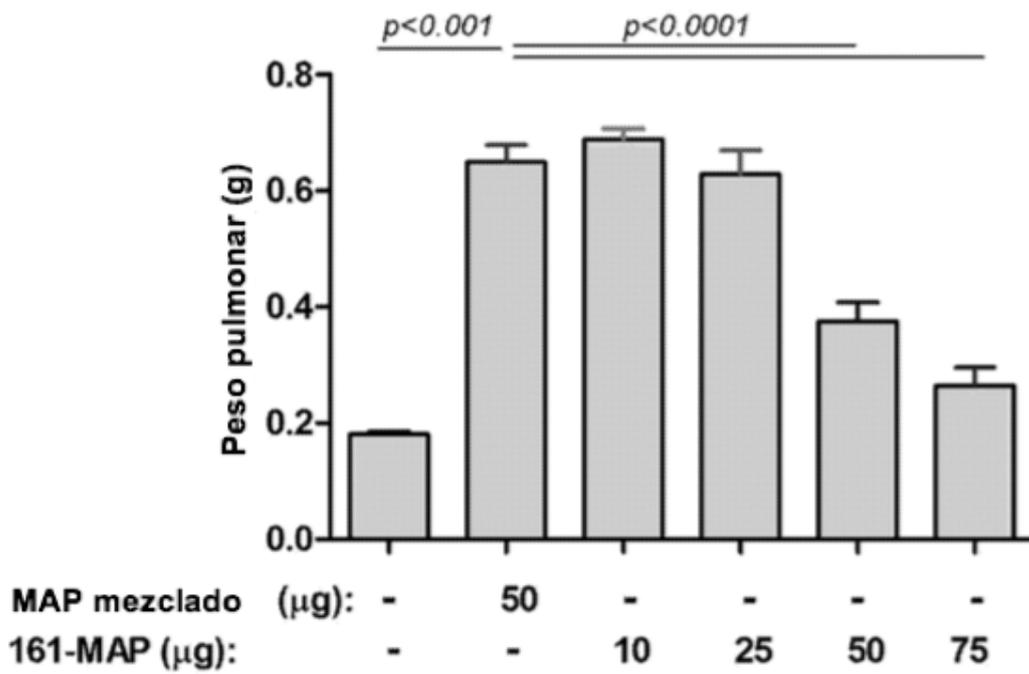
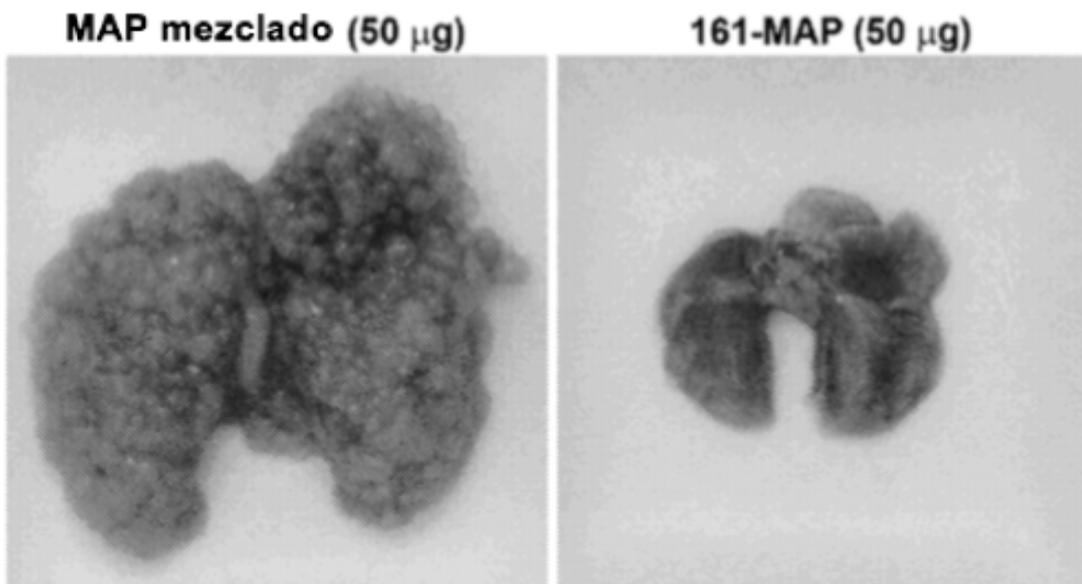


FIGURA 12C



**FIGURA 12D**

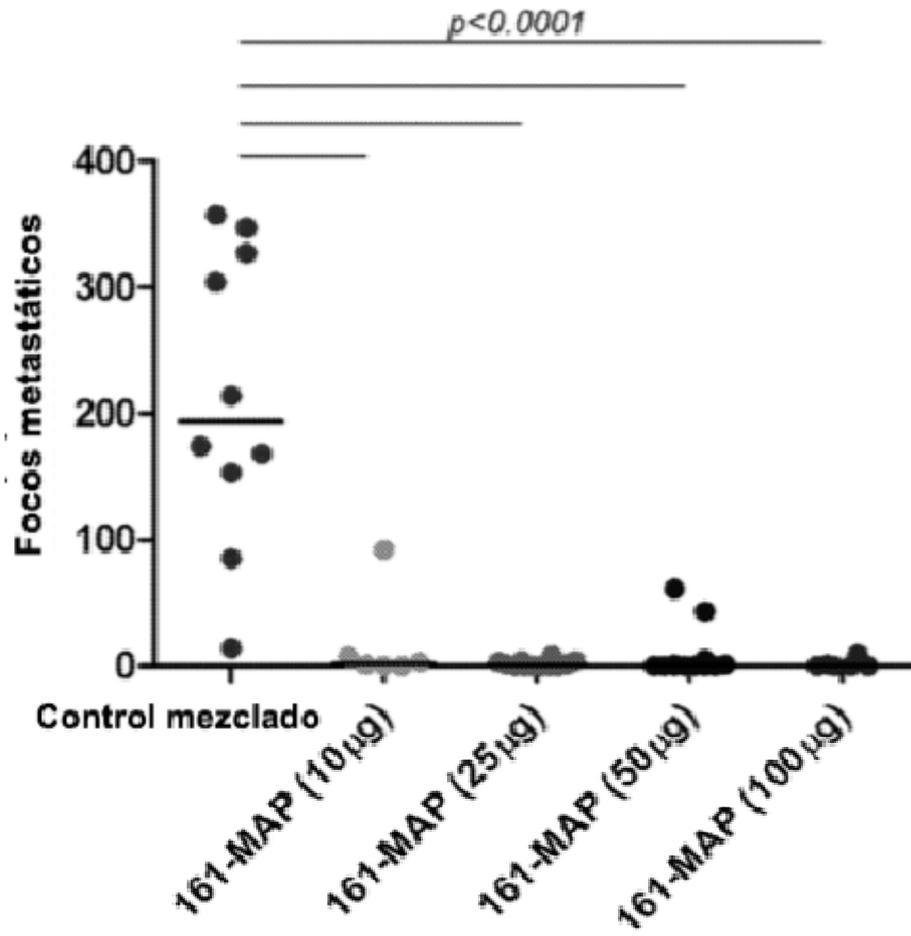


FIGURA 12E

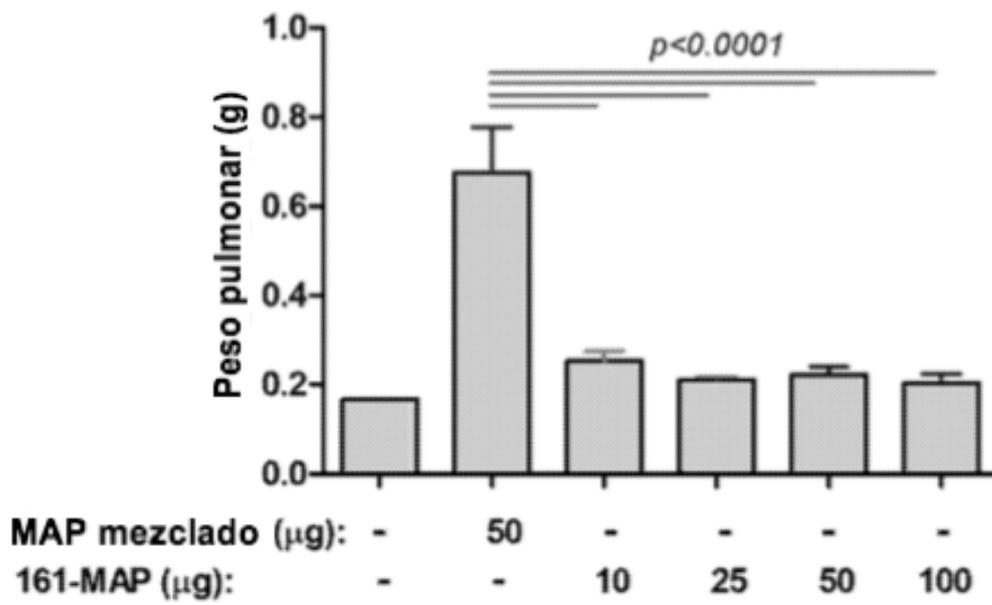


FIGURA 12F