

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 908**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2011 PCT/EP2011/059868**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11157724**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2011 E 11725442 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2580240**

54 Título: **Anticuerpos S100A4 y usos terapéuticos de los mismos**

30 Prioridad:

14.06.2010 EP 10382170

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

26.06.2019

73 Titular/es:

**LYKERA BIOMED S.A. (100.0%)
C/ de la Innovació 2
08225 Terrasa, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**HERNÁNDEZ MÍGUEZ, JOSÉ LUIS;
ADÁN PLANA, JAUME;
MARTÍNEZ ESCOLÀ, JOSEP MARÍA;
MASA ÁLVAREZ, MARC;
MESSEGUER PEYPOCH, RAMÓN;
MITJANS PRAT, FRANCESC;
DAKHEL PLAZA, SHEILA;
COLL MANZANO, ANTONIO;
HERVÁS VILLEGAS, ROSA M^a;
CALVIS CALPE, CARME;
PADILLA GARCÍA, LAURA;
ROQUE NAVARRO, LOURDES TATIANA;
BARBERÀ FERRANDO, LAURA;
RIVAS CAÑAS, MANUEL y
GÓMEZ CASAJUS, LUIS ÀNGEL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 717 908 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

Anticuerpos S100A4 y usos terapéuticos de los mismos

Campo de la invención

5 La invención se refiere a la inmunología molecular y al tratamiento de enfermedades humanas. En particular, se refiere a anticuerpos contra S100A4 humana, a composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos y a usos terapéuticos y de diagnóstico de los mismos.

Antecedentes de la invención

10 Los cánceres son el tipo más frecuente de malignidades humanas y la muerte por cáncer es resultado predominantemente de la diseminación de células tumorales primarias a sitios distantes y la posterior formación de metástasis.

La implicación causal de la proteína inductora de metástasis S100A4, un miembro de la familia S100 de proteínas de unión a calcio, en la progresión tumoral, la angiogénesis y la diseminación metastásica ha sido demostrada por diversos enfoques.

15 S100A4 desempeña un papel fundamental en el diálogo tumor-estroma que se produce entre las células tumorales y su estroma (incluyendo fibroblastos, endotelio, musculatura lisa, células inflamatorias y neuronales) mediada principalmente por contacto directo célula-célula o citocina autocrina/paracrina y señalización por factores de crecimiento. Por ejemplo, el factor de crecimiento epitelial, el factor de crecimiento tumoral- β 1 y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 son capaces de estimular la expresión de S100A4 (Strutz y col. *Kidney Int.* 2002; 61 (5): 1714-1728); S100A4 liberada por células tumorales o estromales en el medio tumoral desencadena cascadas pro-metastásicas en células tumorales (Grum-Schwensen y col. *Cancer Res.* 2005; 65 (9): 3772-3780); células tumorales o fibroblastos asociados a tumor, a diferencia de los fibroblastos normales, expresan altos niveles de S100A4 (Ambartsumian y col. *Oncogene.* 1996; 13 (8): 1621-1630); otras células del estroma del tumor derivadas del huésped, tales como linfocitos y macrófagos, aumentan la expresión de S100A4 tras su activación (Grigorian y col. *Electroforesis.* 1994; 15 (3-4): 463-468).

25 S100A4 también influye en la angiogénesis tumoral a través de la estimulación y remodelación de la matriz extracelular (producción de enzimas degradadoras) y la motilidad de las células endoteliales, actuando como un factor proangiogénico (Schmidt-Hansen y col. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (23): 24498-24504).

30 El propio gen de S100A4 se aisló originalmente como un gen expresado diferencialmente en adenocarcinoma mamario de ratón altamente metastásico (Ebraldze y col. *Genes Dev.* 1989; 3 (7): 1086-1093). También se ha demostrado que la introducción del gen de S100A4 en estirpes celulares de tumores no metastásicas, así como la supresión del gen en células metastásicas modificaba el destino metastásico y oncógeno de dichas células, demostrando, por tanto, su implicación en la progresión tumoral y la formación de metástasis (Lloyd y col. *Oncogene* 1998; 17 (4): 465-473).

35 En la clínica, se ha demostrado una correlación positiva entre los niveles altos de expresión de S100A4 y mal pronóstico en pacientes con cáncer para carcinoma de mama (Rudland PS y col. *Cancer Res.* 2000; 60 (6): 1595-1603), carcinoma de próstata (Saleem M y col. *PNAS.* 2006; 103 (40): 14825-30), carcinoma de pulmón (Tsunami M y col. *Anticancer Res.* 2009; 29 (7): 2547-54), carcinoma colorrectal (Cho Y y col. *World J Gastroent.* 2005; 11 (31): 4852-6), carcinoma pancreático (Rosty C y col. *Am J Pathol.* 2002; 160 (1): 45-50), carcinoma renal (Bandiera A y col. *World J Surg.* 2009; 33 (7): 1133-1137), carcinoma gástrico (Yonemura Y y col. *Clin Cancer Res.* 2000; 6 (II): 4234-42), carcinoma de ovario (Maelandsmo GM y col. *Tumor Biol.* 2009; 30 (1): 15-25), carcinoma papilar de tiroides (Min HS y col. *Mod Pathol.* 2008; 21 (6): 748-55), melanoma (Andersen K y col. *Mod Pathol.* 2004; 17 (8): 990-997), carcinoma hepatocelular (Cui J y col. *J Can Res Clin Oncol.* 2004; 130 (10): 615-22), carcinoma de vejiga (Agerbaek M y col. *Eur. Urol.* 2006; 50 (4): 777-785), carcinoma liposarcoma invasivo (Pazzaglia L y col. *Anticancer Res.* 2004; 24 (2B): 967-972), neuroblastoma (Bjomland K y col. *J Pediatr Surg.* 2001; 36 (7): 1040-1044), carcinoma escamoso esofágico (Ninomiya I y col. *Int J Oncol.* 2001; 18 (4): 715-20), osteosarcoma (Mathisen B y col. *Clin Exp Metastasis.* 2003; 20 (8): 701-11), carcinoma de vesícula biliar (Nakamura T y col. *Int J Oncol.* 2002; 20 (5): 937-41), carcinoma escamoso oral (Moriyama-Kita M y col. *Oral Oncol.* 2004; 40 (5): 496-500), carcinoma de endometrio (Xie R y col. *Lab Invest.* 2009; 89 (8): 937-947) y el meduloblastoma (Hernán R y col. *Cancer Res.* 2003; 63 (1): 140-148), entre otros.

50 También se han demostrado implicaciones de S100A4 en diversas afecciones patológicas no malignas por diversos grupos de investigación, en particular, en patologías tales como la inflamación autoinmune y trastornos en los sistemas cardiovascular, nervioso y pulmonar (Grigorian M y col. *Current Molecular Medicine.* 2008; 8 (6): 492-6). S100A4 es, por tanto, una diana candidata para aplicaciones clínicas. Sin embargo, debido a la complejidad de la función biológica de S100A4 y a su mecanismo de acción no del todo conocido, no existen todavía inhibidores que bloqueen las funciones ya sean intracelulares o extracelulares de esta proteína.

55 La terapia basada en anticuerpos ha surgido como una parte integral de tratamientos eficaces para un número de

enfermedades. En la última década, los anticuerpos monoclonales se han convertido en importantes agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades malignas y no malignas.

5 Hasta la fecha, diferentes compañías y grupos de investigación han proporcionado anticuerpos monoclonales y policlonales generados contra S100A4 (Zhang y col., *Calcium Binding Proteins*. 2006; 1 (4): 219-223; ABIN167355 y ABIN171123 de Antibodies-Online GmbH, Alemania; A5114 de DakoCytomation, Dinamarca, entre otros). Aunque las enseñanzas científicas y de patentes especulan sobre las aplicaciones terapéuticas de estos anticuerpos, hasta donde saben los inventores, todavía no existen pruebas de que los anticuerpos del estado de la técnica hayan resuelto realmente el problema del tratamiento del cáncer y de las enfermedades no malignas.

10 El documento WO2000064475 (Research Corporation Technologies, Inc.) desvela un procedimiento para el diagnóstico de cáncer maligno (i) inhibiendo la proteína mts-1 con anticuerpos dirigidos contra la proteína mts-1 (los anticuerpos pueden conjugarse con una toxina) o (ii) proporcionando un ácido nucleico que codifica una secuencia de nucleótidos antisentido de mts-1.

15 Por tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica de proporcionar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer, en particular para el tratamiento de la angiogénesis y la metástasis, que se dirijan a la proteína S100A4.

20 Además, a nivel de diagnóstico, S100A4 puede considerarse un buen marcador en el proceso de diferenciación de una célula normal hacia una célula tumoral y, por tanto, es un buen biomarcador en el examen citológico de los tumores. Sin embargo, la detección de la expresión de S100A4 en el tejido canceroso presenta el inconveniente de requerir una biopsia del paciente. Por tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica para proporcionar un procedimiento más simple y menos invasivo para el diagnóstico clínico del cáncer por medio de la detección de los niveles de S100A4 en un sujeto.

Sumario de la invención

25 En un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-S100A4 específico que tiene actividad antiangiogénica o a un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo en el que el anticuerpo es producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804.

En otro aspecto, la invención se refiere a una estirpe celular de hibridoma seleccionada entre el grupo que consiste en una estirpe celular depositada con número de acceso ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051802.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 En otro aspecto más, la invención se refiere a un anticuerpo anti-S100A4 específico que tiene actividad antiangiogénica o a un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva sustancialmente la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo en la que el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en:

- (i) Un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia ELPSFLGKRT (SEQ ID NO: 3),
- (ii) Un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia EGFPDKQPRKK (SEQ ID NO: 24) y
- 40 (iii) Un anticuerpo producido por el hibridoma ECACC 11051804

para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en metástasis, una enfermedad donde se produce angiogénesis patógena y una enfermedad inflamatoria.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a un conjugado que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a S100A4 del mismo de acuerdo con la invención y un segundo componente seleccionado entre el grupo de:

- 45 (a) un agente antiangiogénico
- (b) un agente antimetastásico
- (c) un agente citotóxico
- (d) un agente antiinflamatorio

50 así como a los usos del mismo en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre una metástasis, una enfermedad donde se produce angiogénesis y una enfermedad inflamatoria.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para obtener un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención que comprende cultivar una estirpe celular de hibridoma seleccionada entre las estirpes celulares

depositadas con el número de acceso ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 en condiciones que permiten la producción de dicho anticuerpo.

5 En aspectos adicionales, la invención se refiere a la composición que comprende un anticuerpo anti-S100A4 específico y un antimetabolito, así como a los usos de la misma en la prevención y/o el tratamiento del cáncer o metástasis.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un anticuerpo que se une específicamente a la proteína S100A4 o de un fragmento del mismo con capacidad para unirse al antígeno para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a inflamación.

10 En otro aspecto más, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar cáncer o una enfermedad asociada a inflamación en un sujeto, que comprende:

- 15 (a) detectar los niveles de la proteína S100A4 en un biofluido de dicho sujeto por medio del uso de un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo que consiste en ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo
(b) comparar dichos niveles con un valor de referencia

en el que valores aumentados de la proteína S100A4 con respecto al valor de referencia son indicativos de que el sujeto padece cáncer o una enfermedad asociada a inflamación.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un procedimiento para la detección de S100A4 en una muestra, que comprende:

- 20 (i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener S100A4 con un anticuerpo anti-S100A4 específico o un fragmento del mismo como se define en la invención
(ii) detectar la formación de complejos inmunitarios entre S100A4 y el anticuerpo o el fragmento del mismo

en el que la detección de complejos inmunitarios entre S100A4 y el anticuerpo es indicativa de la presencia de S100A4 en la muestra.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para diagnosticar cáncer o una enfermedad asociada a inflamación en un biofluido que comprende al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto diagnosticado con cáncer que comprende detectar los niveles de la proteína S100A4 en un biofluido de dicho sujeto por medio del uso de un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo que consiste en ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo antes y después de la terapia con el mismo anticuerpo monoclonal, en el que un aumento de los niveles de la proteína S100A4 después de la terapia con respecto a los niveles de S100A4, antes de la terapia, es indicativo de que el paciente necesita una terapia alternativa a la terapia administrada originalmente.

35 Es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos que se unan específicamente a S100A4 humana o murina y no a las otras proteínas de la familia S100.

Es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos que se unan con sensibilidad a S100A4 humana o murina en un límite de detección de nanogramos, incluso picogramos.

40 De forma importante, es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos terapéuticos contra S100A4 con una actividad demostrada contra enfermedades malignas y no malignas.

De forma importante, es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos terapéuticos contra S100A4 con una actividad demostrada *in vivo* contra enfermedades malignas y no malignas, sin ser metabolizados o degradados antes de realizar su función en el cuerpo.

45 De forma importante, es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos terapéuticos contra S100A4 con una actividad demostrada contra enfermedades malignas y no malignas con efectos tóxicos mínimos o sin efectos tóxicos.

Es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos contra S100A4 que puedan inhibir el crecimiento tumoral.

50 Es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos contra S100A4 que puedan inhibir el desarrollo de tumores.

Es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos contra S100A4 que puedan inhibir la angiogénesis y

la angiogénesis tumoral.

Es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos contra S100A4 que puedan inhibir la migración de células endoteliales.

5 Es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos contra S100A4 que puedan inhibir células madre cancerosas.

Es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos contra S100A4 que puedan inhibir procesos inflamatorios.

Descripción de las figuras

10 **Figura 1.** Expresión de la proteína S100A4 determinada por análisis de transferencia Western. **(A)** Niveles de expresión de S100A4 en extractos totales de estirpes celulares tumorales de diferentes orígenes y la estirpe celular fibroblástica embrionaria de ratón NIH3T3. **(B)** Niveles de expresión de S100A4 en extracto total de tumores de modelos de xenoinjerto derivados de HCT116, MiaPaCa-2 y BxPC3. **(C)** Niveles de expresión de S100A4 en extractos totales de la estirpe celular tumoral MDA-MB-231 y en las células madre cancerosas derivadas de esta estirpe celular.

15 **Figura 2.** Análisis inmunohistoquímico de la expresión de S100A4. Análisis inmunohistoquímico comparativo de la expresión y distribución de S100A4 en tumores derivados de dos estirpes celulares de adenocarcinomas pancreáticos Panel y BxPC3, entre 5C3 y el anticuerpo policlonal de conejo más citado (Dako) contra S100A4 usado en histología. Las imágenes **(A-D)** se tomaron a un aumento X 40. Las imágenes **(E-H)** se tomaron a un aumento X 120. **(A)** Se muestra una expresión más fuerte de S100A4 en los frentes invasivos que en el centro del tumor en una muestra derivada de un modelo de xenoinjerto de estirpe celular BxPC3 teñida con el anticuerpo monoclonal de ratón 5C3. **(B)** Se muestra una expresión de S100A4 más fuerte en los frentes invasivos que en el centro del tumor en una muestra derivada de un modelo de xenoinjerto de estirpe celular BxPC3 teñida con un anticuerpo policlonal de conejo de Dako **(C)** Tinción con un anticuerpo monoclonal de ratón no relacionado anti-polihistidina usado como un control negativo en un tumor derivado de un modelo de xenoinjerto de la estirpe celular BxPC3. **(D)** Tinción control negativo sin anticuerpo primario en una muestra tumoral derivada de un modelo de xenoinjerto de la estirpe celular BxPC3. **(E)** Fuerte expresión de S100A4 en el citoplasma y núcleos de un tumor derivado de un modelo de xenoinjerto de la estirpe celular Panc-1 teñida con el anticuerpo monoclonal de ratón 5C3. **(F)** Fuerte expresión de S100A4 en el citoplasma y núcleo de un tumor derivado de un modelo de xenoinjerto de la estirpe celular Panc-1 teñida con un anticuerpo policlonal de conejo de Dako. **(G)** Tinción con un anticuerpo monoclonal de ratón no relacionado anti-polihistidina usado como un control negativo en un tumor derivado de un modelo de xenoinjerto de la estirpe celular Panc-1. **(H)** Tinción de control negativo sin anticuerpo primario en muestra tumoral derivada de un modelo de xenoinjerto de la estirpe celular Panc-1.

35 **Figura 3.** 5C3 neutraliza la actividad proteolítica de MMP9 inducida por S100A4. Actividad proteolítica de las MMP en medio condicionado de HUVEC. Las HUVEC se trataron con los diferentes estímulos durante 24 horas. Los sobrenadantes se centrifugaron para eliminar los desechos y se analizaron por zimografía en gelatina. Las bandas más transparentes representan la actividad de MMP9 y MMP2. **(A)** S100A4 aumenta la secreción de formas activas de MMP9 de una manera dependiente de la dosis. **(B)** El anticuerpo monoclonal 5C3 neutralizó la producción de formas activas de MMP9 inducida por la proteína recombinante S100A4.

40 **Figura 4.** Efecto inhibitorio de varios anticuerpos monoclonales contra S100A4 en la migración de las HUVEC. Antes de la inducción de la migración, los anticuerpos se incubaron con la proteína S100A4 durante 2 h a 37 °C. Las HUVEC se trataron con S100A4 (1 µM), VEGF (3 ng/ml), la combinación de VEGF más S100A4 o la combinación de estas proteínas con los anticuerpos (5C3, 1E2, 8B6, 6B9, 5A3, 5H4) durante 24 h. **(A)** Las células se trataron con 5C3 (0,25, 0,5, 1, 2 y 4 µM) y el 5H4 (4 µM), durante 24 h. Cada punto de datos se normalizó respecto al control positivo (barra izquierda) que representa el 100 % de la migración. El control positivo corresponde a células incubadas con EBM más complementos (EGM) y FCS (medio completo). **(B)** Las células se trataron con 5C3, 1E2, 8B6, 6B9, 5A3 (2 µM) durante 24 h. Cada punto de datos se normalizó respecto a la migración inducida por VEGF más S100A4 que representa el 100 % de la migración. Las barras muestran la media ± d. t. ** p < 0,005 ("ensayo U de Mann-Whitney").

50 **Figura 5.** Actividad antitumoral del anticuerpo 5C3 en tumores de páncreas humano (MiaPACA-2). Ratones desnudos, hembras, atímicos, se inocularon subcutáneamente con 5×10^6 de células MiaPACA-2 en 0,1 ml de medio de cultivo sin complementos, en el flanco derecho superior de los ratones el día 0. Se inició el tratamiento cuando los tumores alcanzaron 65-160 mm para las células MiaPACA-2. Los grupos de tratamiento tenían 10 animales. Se administró PBS (control negativo) o 5C3 (25 mg/kg) por vía intraperitoneal tres veces a la semana (1010100). Se administró tampón de formulación final como control de vehículo. El tamaño del tumor se midió tres veces por semana y el volumen tumoral se calculó de acuerdo con la ecuación: tamaño del tumor = ancho² x largo/2. Al final del experimento (día 30 para las células MiaPACA-2), los ratones portadores de tumores se sacrificaron y se les extrajeron y pesaron los tumores. **(A, B)** Resultados para el experimento de MiaPACA-2. Los

gráficos de volumen tumoral relativo y peso tumoral muestran la media \pm d. t. ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ ("ensayo U de Mann-Whitney").

Figura 6. Calendario de dosificación con el anticuerpo monoclonal 5C3 en ratones desnudos.

Figura 7. Cuantificación de microvasculatura tumoral. Análisis inmunohistológico de microvasculatura (anticuerpo monoclonal murino CD31) de tumores de MiaPACA-2. Se midieron los niveles de vasculatura al final del experimento (día 30) comparando el grupo control de PBS y los animales tratados con el anticuerpo monoclonal 5C3. **(A)** Densidad vascular en un área tumoral definida (DMV) expresada como la media de los perfiles vasculares (p.v.) por mm^2 . **(B)** Cuantificación del área de los vasos en el tumor **(Aa)**. Se hicieron cuantificaciones analizando entre 8 y 39 imágenes por corte, dependiendo del tamaño de los tumores a una ampliación de 120X. Se analizaron las imágenes utilizando el software de imagen NIH ImageJ. Los gráficos muestran la media \pm d. t. * $p < 0,05$ ("ensayo de Mann-Whitney").

Figura 8. El anticuerpo monoclonal 5C3 no muestra ningún efecto tóxico *in vivo*. Se inocularon ratones desnudos, hembras, atímicos subcutáneamente con 5×10^6 células MiaPACA-2 o 1×10^6 células de HCT116 en 0,1 ml de medio de cultivo sin complementos, en el flanco derecho superior de los ratones el día 0. Cuando los tumores alcanzaron 65-160 mm^3 para MiaPACA-2 o 155-370 mm^3 para las células HCT116, se inició el tratamiento. Los grupos de tratamiento tenían 10 o 7 animales para células de MiaPACA-2 o HCT116, respectivamente. Se administró PBS (control negativo) o 5C3 (25 mg/kg) por vía intraperitoneal tres veces a la semana (1010100). Se administró tampón final de formulación como control de vehículo. El peso corporal se midió tres veces por semana a lo largo del experimento. El gráfico de peso corporal muestra la media \pm d. t.

Figura 9. Determinación de los niveles plasmáticos de S100A4. Se determinaron los niveles plasmáticos de la proteína S100A4 sobre varios modelos de xenoinjertos en ratones atímicos (MiaPACA-2, HCT116, MDAMB-231, Colo205) comparados con niveles de S100A4 en animales sin tumor (Basal-02) por el procedimiento de ELISA sándwich. Las condiciones de MiaPACA-2+5C3 y HCT116+5C3 representan los niveles de S100A4 en el plasma, no unida al anticuerpo monoclonal 5C3. Los niveles plasmáticos se midieron al final del experimento. Los gráficos de los niveles plasmáticos muestran la media \pm d. t.

Figura 10. Efecto sinérgico de la Gemcitabina combinada con el anticuerpo monoclonal 5C3 en la viabilidad celular. Efecto de la Gemcitabina sola o combinada con el anticuerpo monoclonal 5C3 sobre la viabilidad celular medida por actividad de hexosaminidasa. El efecto citotóxico dosis-respuesta de la Gemcitabina mejora de forma sinérgica con la combinación del anticuerpo monoclonal 5C3. Se incubaron células de MiaPACA-2 con el fármaco quimioterápico a diferentes dosis, con o sin 5C3, a una concentración constante de 40 nM o 100 nM, durante 72 h. La viabilidad se normalizó respecto al control positivo, células sin compuestos (gemcitabina o 5C3), que representa el 100 % de viabilidad.

Figura 11. Efecto inhibitorio del anticuerpo monoclonal 5C3 sobre la liberación de IL-8 inducida por S100A4 en monocitos THP-1. **(A)** Dosis-respuesta de S100A4 sobre la IL-8 secretada por monocitos THP-1 después de 24 horas de incubación y comparada con la secreción inducida por LPS (control positivo). **(B)** Efecto de 5C3, sobre la liberación de IL-8 en monocitos THP-1 tratados con S100A4 a 3 μM durante 24 horas. Las células se trataron siempre con anti-IgG de ratón (Fc específico) para evitar la liberación de IL8 inducida por el receptor de Fc. La IL8 de los sobrenadantes se analizó por ELISA. Los valores representan la media \pm d. t.

Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto que, inesperadamente, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína S100A4 son capaces de neutralizar la migración inducida por S100A4 de células endoteliales en un ensayo de motilidad *in vitro* (véase el ejemplo 9), así como de neutralizar la capacidad angiogénica inducida por S100A4 en un modelo de xenoinjerto de tumor (véase el ejemplo 11). Estos resultados indican que los anticuerpos anti-S100A4 son útiles para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades asociadas a la metástasis y a la angiogénesis no deseada, tales como el cáncer.

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína S100A4 humana y murina, designados como 5C3, 1E2, 6B9, 5A3 y 8B6 que interactúan específicamente con y bloquean la actividad angiogénica de S100A4. Los inventores han encontrado sorprendentemente que estos anticuerpos tienen valiosas actividades farmacológicas, puesto que bloquean el desarrollo tumoral, la angiogénesis tumoral y tienen, además, ninguno o mínimos efectos secundarios tóxicos *in vivo*. De modo interesante, el trabajo realizado por los inventores ha revelado un nuevo mecanismo de bloqueo de la acción de dichos anticuerpos en la migración de células endoteliales inducida por S100A4.

Los autores de la presente invención han demostrado adicionalmente que los niveles de S100A4 en un biofluido son adecuados como un marcador de diagnóstico para la detección precoz del cáncer. Por tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento *in vitro* y a kits para el diagnóstico de cáncer en un paciente por medio de la detección de los niveles de S100A4 en un biofluido con dichos anticuerpos.

Anticuerpos antiangiogénicos de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-S1,00A4 específico que tiene actividad antiangiogénica o a un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo en el que el anticuerpo es producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804.

Como se usa en el presente documento en el primer aspecto de la invención, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína monomérica o multimérica que comprende al menos un polipéptido que tiene la capacidad de unirse a un antígeno determinado y que comprende toda o parte de la región variable de la cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina. El término anticuerpo incluye cualquier tipo de anticuerpo conocido, tal como, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y anticuerpos modificados genéticamente, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos primatizados, anticuerpos humanos y anticuerpos biespecíficos. Una definición más amplia del término "anticuerpo" se puede encontrar en la sección "Definiciones". Las expresiones "anticuerpos policlonales" y "anticuerpos monoclonales" se definen en la sección "Definiciones". En una realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Se entiende por "anticuerpos quiméricos" anticuerpos contruidos con regiones variables de un anticuerpo de una especie (por lo general un mamífero en el que se generó el anticuerpo monoclonal) y regiones constantes de otra especie (especie en la que el anticuerpo quimérico se va a usar). El objetivo de dicha construcción es obtener un anticuerpo con el anticuerpo monoclonal original, pero que sea menos inmunógeno y se tolere mejor en el sujeto que se va a tratar, con una semivida en suero mejorada y que pueda ser reconocido por mecanismos efectores inmunológicos, es decir, el complemento, el receptor Fc de células citotóxicas u otros receptores específicos de inmunoglobulinas que muestren especificidad de especie. En una realización preferente, los anticuerpos quiméricos están formados por regiones variables murinas y regiones constantes humanas.

Por "anticuerpo humanizado" se entiende un anticuerpo procedente de un organismo no humano, normalmente un anticuerpo murino, que conserva las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo parental, pero que es menos inmunógeno en seres humanos. Esto puede conseguirse por medio de diferentes procedimientos, que incluyen (a) injertar los dominios variables no humanos completos en regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos, (b) injertar solamente las regiones determinantes de complementariedad no humanas (CDR, por sus siglas en inglés) en una región marco conservada humana y las regiones constantes, conservando o no los restos estructurales críticos de la región marco conservada y (c) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero "ocultándolos" con una sección similar al dominio variable humano por medio de la sustitución de los restos de superficie.

Por "anticuerpo primatizado" se entiende un anticuerpo recombinante que se ha manipulado genéticamente para que contenga los dominios variables pesado y ligero de un anticuerpo de mono (o de otro primate), en particular un anticuerpo de un macaco, y que contenga secuencias de un dominio constante humano, preferentemente el dominio constante de la inmunoglobulina humana gamma 1 o 4 (o una variante PE). La preparación de dichos anticuerpos se describe en Newman y col., *Biotechnology*, 10: 1458-1460 (1992); y en los documentos de patente US 5.658.570 y US 6.113.898. Se ha descrito que estos anticuerpos muestran un alto grado de homología con los anticuerpos humanos, es decir, un 85-98 %, tienen funciones efectoras humanas, tienen menor inmunogenicidad y pueden mostrar una alta afinidad por los antígenos humanos. Otro medio muy eficaz para generar anticuerpos recombinantes es el descrito por Newman, *Biotechnology*, 10: 1455-1460 (1992).

Por "anticuerpo humano" se entiende un anticuerpo que contiene las cadenas ligeras y las cadenas pesadas integralmente humanas, así como regiones constantes, producidas mediante cualquiera de los procedimientos convencionales conocidos. Una definición más amplia se encuentra en la sección "Definiciones".

La expresión "anticuerpos biespecíficos" o "anticuerpos bifuncionales" se define en la sección "Definiciones".

La invención también comprende el uso de fragmentos de los diferentes tipos de anticuerpos mencionados anteriormente, que conservan substancialmente la actividad antiangiogénica del anticuerpo. La expresión "fragmento de anticuerpo" incluye fragmentos de anticuerpo tales como Fab, F(ab')₂, Fab', fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), diacuerpos y nanocuerpos.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos denominados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión al antígeno único y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de unión al antígeno y que todavía es capaz de entrecruzarse con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un lugar de unión y un lugar de reconocimiento completos del antígeno. Esta región consiste en un dímero formado por los dominios variables de una cadena variable ligera y una cadena variable pesada en una unión fuerte no covalente. En esta configuración, las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis regiones hipervariables confieren especificidad antígeno-anticuerpo con el anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv, el cual comprende solamente tres regiones

hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocimiento y de unión al antígeno, aunque con menor afinidad que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un polipéptido de engarce entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol.113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, N.Y., páginas 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Por medio del uso de un engarce que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

El término "nanocuerpos" designa entidades de pequeño tamaño (15 kDa) formadas únicamente por la región de unión a antígeno de la cadena pesada (fragmento VH) de las inmunoglobulinas. Dichos nanocuerpos se producen principalmente después de la inmunización de animales de la familia Camelidae, tales como camellos, llamas y dromedarios, principalmente llamas; y también de la familia de los tiburones, que tienen la particularidad de tener anticuerpos que carecen naturalmente de la cadena ligera y reconocen el antígeno por el dominio variable de la cadena pesada. Sin embargo, los nanocuerpos derivados de estas fuentes requieren un procedimiento de humanización para su aplicación terapéutica. Otra fuente potencial para obtener nanocuerpos es a partir de anticuerpos derivados de diferentes muestras humanas mediante la separación de los dominios VH y VL de la región variable. Los nanocuerpos presentan ventajas tales como una reducción del coste de producción con respecto a los anticuerpos completos, la estabilidad y la reducción de la inmunogenicidad.

Otros fragmentos de anticuerpos se enumeran en la sección "Definiciones".

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención tienen actividad antiangiogénica. La expresión "tiene actividad antiangiogénica", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de los anticuerpos para inhibir la angiogénesis inducida por S100A4. La actividad antiangiogénica puede determinarse *in vitro* determinando la capacidad del anticuerpo o fragmento del mismo para bloquear la migración de las células HUVEC inducida por S100A4 como se muestra por ejemplo en el ejemplo 9 de la presente solicitud o *in vivo* mediante la determinación de la capacidad del anticuerpo para bloquear la formación de vasculatura tumoral en carcinomas derivados de la implantación de células tumorales que sobreexpresan S100A4 como se describe en el ejemplo 11 de la presente invención. De acuerdo con la presente invención, se considera que un anticuerpo anti-S100A4 es antiangiogénico si bloquea al menos el 100 %, al menos el 90 %, al menos el 80 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, al menos el 50 %, al menos el 40 %, al menos el 30 %, al menos el 20 % o al menos el 10 % de la actividad angiogénica de la proteína S100A4.

Los fragmentos de anticuerpo incluidos en el primer aspecto de la presente invención conservan la capacidad para unirse al antígeno de la S100A4 del anticuerpo completo del que derivan y también conservan la función de inhibir la actividad angiogénica de la proteína S100A4.

La expresión "conservar la actividad antiangiogénica del anti-S100A4 específico", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad del fragmento de anticuerpo para mostrar sustancialmente la actividad antiangiogénica del anticuerpo completo. La actividad antiangiogénica puede determinarse *in vitro* determinando la capacidad del anticuerpo o fragmento del mismo para bloquear la migración de las células HUVEC inducida por S100A4 como se muestra por ejemplo en el ejemplo 9 de la presente solicitud o *in vivo* mediante la determinación de la capacidad del anticuerpo para bloquear la formación de vasculatura tumoral en carcinomas derivados de la implantación de células tumorales que sobreexpresan S100A4 como se describe en el ejemplo 11 de la presente invención. La inhibición de la formación de la vasculatura tumoral puede medirse como una disminución en el número de microvasos en comparación con los animales no tratados con el anticuerpo o como una disminución en la densidad de microvasos en comparación con los animales no tratados con el anticuerpo. Un fragmento de anticuerpo conserva la actividad antiangiogénica del anticuerpo si muestra por lo menos el 100 %, el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 94 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 85 %, el 80 %, el 75 %, el 70 %, el 65 %, el 60 %, el 55 % o el 50 % de la actividad del anticuerpo.

Los anticuerpos útiles en la invención deben ser específicos para la proteína S100A4. El término "específico" se refiere a la capacidad de los anticuerpos para unirse específicamente a la proteína S100A4 y no a otras proteínas de

la familia de las S100.

5 Para identificar los anticuerpos con la especificidad deseada, pueden utilizarse ensayos inmunoquímicos, tales como inmunofluorescencia, citometría de flujo, transferencia Western y ensayos de ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones u otros ensayos inmunoquímicos conocidos en el estado de la técnica. Se conoce en el estado de la técnica un número de protocolos para ensayos de unión competitiva o inmunoradiométricos. Dichos inmunoensayos normalmente implican la medición de la formación de un complejo entre un anticuerpo y un inmunógeno de la proteína S100A4.

10 El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención incluye un anticuerpo producido por el hibridoma ECACC 11051804.

15 La expresión "anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4" indica que el anticuerpo es capaz de mostrar la unión específica al epítipo sin mostrar una unión sustancial para otros epítipos que no comprenden esta secuencia. Los medios adecuados para determinar si un anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo se muestran en el ejemplo 14 de la presente invención, en el que los péptidos que representan la secuencia completa de la proteína diana, se someten a ensayo contra el anticuerpo o fragmento del mismo. Un anticuerpo se considera que se une específicamente a un epítipo dado si se une a un péptido que comprende la secuencia del epítipo con una afinidad sustancialmente mayor que la de un péptido que no comprende la secuencia de dicho epítipo. La expresión "afinidad sustancialmente mayor", como se usa en el presente documento, se refiere a un nivel de afinidad para una secuencia de aminoácidos particular que es distinguible de la del nivel de otra secuencia de aminoácidos cuando se detecta con un procedimiento o un dispositivo de medición destinado para ello. Preferentemente, la afinidad de la unión entre el anticuerpo y el péptido que comprende el epítipo es al menos un orden de magnitud superior, al menos dos órdenes de magnitud superior, al menos tres órdenes de magnitud superior, al menos cuatro órdenes de magnitud superior, al menos cinco órdenes de magnitud superior, al menos seis órdenes de magnitud superior que la afinidad de la unión entre el anticuerpo y un péptido que no comprende la secuencia del epítipo. La constante de asociación (K_a) de unión con afinidad sustancialmente alta es, por ejemplo, al menos 10^7 M^{-1} , preferentemente al menos 10^8 M^{-1} y, más preferentemente, al menos 10^9 M^{-1} o inferior.

20 El término "S100A4" se define en la sección "Definiciones". El término también incluye todas las formas de modificaciones químicas postraduccionales fisiológicamente relevantes, por ejemplo, glicosilación, fosforilación o acetilación, etc., a condición de que la funcionalidad de la proteína se mantenga. Dicho término abarca la S100A4 de cualquier especie de mamífero, incluyendo, pero no limitándose a animales domésticos y de granja (vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores), primates y seres humanos. Preferentemente, la S100A4 es humana.

25 Como se usa en el presente documento, por "variante funcionalmente equivalente de S100A4" se entiende cualquier molécula que comparte con la S100A4 al menos la función angiogénica que se describe en la presente invención asociada a S100A4, tanto *in vitro* como *in vivo* y que tiene una identidad mínima en la secuencia de aminoácidos. Las variantes de S100A4 pueden ser tanto naturales como artificiales.

30 La expresión "variante natural" se refiere a todas aquellas variantes de la S100A4 humana mencionadas anteriormente que aparecen naturalmente en otras especies, es decir, ortólogos de S100A4. Dichas variantes naturales incluyen, pero no se limitan, a S100A4 de vacas, que corresponde a la secuencia predicha con el número de acceso DAA31755.1 (versión del 21 de mayo de 2010); S100A4 de ratas, que corresponde a la secuencia predicha con el número de acceso NP_036750.1 (versión de 10 de abril 2011); S100A4 de ratón, que corresponde a la secuencia predicha con el número de acceso NP_035441.1 (versión del 29 de mayo de 2011); S100A4 de perros, que corresponde a la secuencia predicha con el número de acceso NP_001003161.1 (versión de 19 de febrero de 2011). Las variantes naturales de S100A4 adecuadas para su uso en el primer aspecto de la presente invención pueden ser también derivadas de dichas secuencias por medio de la inserción, sustitución o delección de uno o más aminoácidos e incluyen alelos naturales, variantes resultantes del procesamiento alternativo y formas secretadas y truncadas que aparecen naturalmente.

35 La S100A4 útil en la presente invención puede, por tanto, ser de una secuencia natural cuando comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos de la S100A4 derivada de la naturaleza. Dichos polipéptidos de una secuencia natural pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes y/o sintéticos. Por tanto, la S100A4 de la invención puede ser una proteína recombinante obtenida mediante la expresión de un polinucleótido que codifica S100A4 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en un organismo heterólogo, tal como una bacteria, levadura o célula de insecto o mamífero. Dicha proteína recombinante se puede obtener como una proteína de fusión con una cola amino-terminal de histidinas para facilitar la posterior purificación de la misma. La expresión y purificación de dichas proteínas puede realizarse de acuerdo con procedimientos conocidos por el experto en la materia y descritos en el estado de la técnica.

40 En una realización preferente, la S100A4 es de origen humano, preferentemente de la secuencia SEQ ID NO: 21. En otra realización preferente, la S100A4 proviene de la expresión de una proteína de fusión que comprende la secuencia de la S100A4 humana con una cola amino-terminal de tres aminoácidos adicionales, cuya secuencia es la SEQ ID NO: 25.

SEQ ID NO: 25 1 GSHMACPLEK ALDVMVSTFH KYSGKEGDKF KLNKSELKEL LTRELPSFLG KRTDEAAFQK
61 LMSNLDNDRD NEVDFQEYCV FLSCIAMMCN EFFEGFPDKQ PRKK

Como alternativa, la S100A4 puede ser una variante artificial funcionalmente equivalente de la S100A4, que puede obtenerse por medios recombinantes y/o sintéticos.

5 Más información acerca del término "variante" se puede encontrar en la sección "Definiciones".

Las variantes de S100A4 contempladas en la divulgación muestran al menos una de las funciones de S100A4, tales como, pero sin limitación:

- La capacidad para activar la actividad metaloproteinasa de la matriz de MMP9, que puede determinarse por medio del procedimiento descrito en el Ejemplo 8 de la presente invención.
- 10 - La capacidad para inducir la migración de células endoteliales, que puede determinarse por medio del procedimiento descrito en el Ejemplo 9 de la presente invención.
- La capacidad para inducir el desarrollo de tumores en ratones desnudos, que puede determinarse por medio del procedimiento descrito en el Ejemplo 10 de la presente solicitud.
- 15 - La capacidad angiogénica o la capacidad de formar microvasculatura tumoral, que puede determinarse por medio del procedimiento descrito en el Ejemplo 11 de la presente solicitud.
- La capacidad para inducir una respuesta inflamatoria en los monocitos mediada por la secreción de IL 8, que puede determinarse por medio del procedimiento descrito en el Ejemplo 16 de la presente solicitud.

Adicionalmente, las variantes funcionalmente equivalentes de S100A4 contempladas en la divulgación, incluyen polipéptidos que muestran al menos el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 72 %, el 74 %, el 76 %, el 78 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % de similitud o identidad con las diferentes variantes naturales de S100A4 mencionadas anteriormente. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina utilizando algoritmos implementados en un ordenador y procedimientos que son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S. y col., *NCBI NLM NIH Bethesda*, Md. 20894, Altschul, S. y col., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215: 403-410). El procedimiento para calcular el grado de identidad se muestra en la sección "Definiciones".

25 La expresión "sustancialmente conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo" significa que el anticuerpo del primer aspecto de la invención no puede perder completamente la actividad antiangiogénica.

En general, también se contemplan modificaciones en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la divulgación. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo los cambios apropiados de nucleótidos en el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para conseguir la construcción final, a condición de que la construcción final tenga las características deseadas, es decir, especificidad de unión a la S100A4 y actividad antagonista antiangiogénica de dicha proteína. Los cambios en los aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Algunas inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino terminales y/o carboxi terminales variando en longitud desde un resto hasta polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones dentro de la secuencia de uno o varios restos de aminoácidos. Algunos ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal, o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes por inserción de la molécula de anticuerpo incluyen fusión con el extremo N o C-terminal del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en suero. Otro tipo de variante es una variante por sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido del anticuerpo sustituido por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución de anticuerpo incluyen las regiones hipervariables, pero las alteraciones en la FR (región marco conservada, por sus siglas en inglés) también se contemplan.

En el contexto de la presente invención, el término "antígeno" se refiere a S100A4.

El anticuerpo anti-S100A4 específico del primer aspecto de la invención reconoce un epítipo del antígeno S100A4. Los inventores han encontrado que los anticuerpos antiangiogénicos de la invención reconocen epítopos contenidos en la región definida por la secuencia ELPSFLGKRT (SEQ ID NO: 3) o por la secuencia EGFPDKQPRKK (SEQ ID NO: 24) de S100A4. La expresión "reconoce un epítipo" significa que el anticuerpo puede unirse a un epítipo como se define en la sección "Definiciones". El epítipo puede estar formado por la secuencia entera ELPSFLGKRT (SEQ ID NO: 3) o EGFPDKQPRKK (SEQ ID NO: 24) o por algunos aminoácidos de dichas secuencias.

55 El anticuerpo anti-S100A4 específico del primer aspecto de la invención puede ser también un anticuerpo monoclonal como se ha definido anteriormente y en la sección "Definiciones". Por tanto, en una realización preferente, el anticuerpo anti-S100A4 específico del primer aspecto de la invención o un fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal.

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales producidos por diferentes estirpes celulares de hibridoma. En particular, el anticuerpo anti-S100A4 específico o fragmento de unión a S100A4 del mismo de acuerdo

con la invención es producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento del mismo.

En el contexto de la presente invención, "célula híbrida" o "hibridoma" se entiende como el producto de la fusión de un clon de célula-B descendiente de una sola célula madre única y de una célula de mieloma. Específicamente, los anticuerpos monoclonales del primer aspecto de la invención corresponden a los anticuerpos monoclonales anti-S100A4 referidos en la parte experimental del presente documento como 5C3, 6B9, 5A3, 1E2 y 8B6, que se han obtenido a partir de los hibridomas generados por los inventores e identificados como 5C3-1B8-1F4, 6B9-1E8-2A8, 5A3-4A6-5B6, 1E2-2H4-2G8 y 8B6-2F6-1H9-1H10, respectivamente. Dichos hibridomas se han depositados antes de la presentación de la presente solicitud de patente en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Porton Down, Salisbury, OJG SP4, Reino Unido, como una institución legalmente reconocida para este fin, de acuerdo con el Tratado de Budapest, de 28 de abril 1977, sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos.

Los depositantes han sido Francesc Mitjans y Marc Masa del Centro Tecnológico Leitat, con dirección Baldiri Reixach 15-21 Edificio Helix, Barcelona, 08028, España.

La Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) ha asignado a los hibridomas 5C3-1B8-1F4, 6B9-1E8-2A8, 5A3-4A6-5B6, 1E2-2H4-2G8 y 8B6-2F6-1H9-1H10 los respectivos números de depósito ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804. Las condiciones de cultivo de dichas estirpes de hibridoma que permiten la obtención de los anticuerpos monoclonales anti-S100A4 de la invención se describen en el contexto del procedimiento para la obtención de los anticuerpos monoclonales de la invención.

En el presente documento, los hibridomas 5C3-1B8-1F4, 6B9-1E8-2A8, 5A3-4A6-5B6, 1E2-2H4-2G8 y 8B6-2F6-1H9-1H10 y los anticuerpos producidos por dichos hibridomas se indican por medio de sus nombres abreviados 5C3, 6B9, 5A3, 1E2 y 8B6, respectivamente.

La invención también contempla fragmentos de dichos anticuerpos monoclonales específicos anti-S100A4 del primer aspecto de la invención que mantienen la capacidad para unirse a S100A4 y también la capacidad antiangiogénica. La capacidad de unión se puede verificar por medio de procedimientos conocidos por el experto en la materia, tales como ELISA o transferencia Western, como se describe en los Ejemplos 5, 6 y 7 de la presente invención. La capacidad para mantener la capacidad antiangiogénica se puede comprobar por medio de procedimientos conocidos por el experto en la materia, tales como los descritos en el Ejemplo 9 de la presente invención.

Dicho "fragmento" se refiere a un fragmento de la secuencia del anticuerpo que se corresponde con una o varias porciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal mencionado que mantiene la capacidad de unirse a S100A4 y por tanto, el polipéptido debe incluir la secuencia de las 6 regiones CDR, que pueden utilizarse para la obtención de los anticuerpos definidos en el contexto del primer aspecto de la invención, tales como, sin limitación, anticuerpos de ingeniería genética tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos biespecíficos. Dicho "fragmento" también se puede utilizar para la obtención de fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F(ab')₂, Fab', fragmentos Fv monocatenario (scFv), diacuerpos o nanocuerpos. Adicionalmente, el fragmento mantiene la capacidad de bloqueo de la angiogénesis.

Los fragmentos Fab y F(ab')₂ se pueden obtener por medio de escisión enzimática o química de los anticuerpos monoclonales intactos del primer aspecto de la invención.

La digestión con papaína de un anticuerpo monoclonal de la invención produce dos fragmentos de unión de antígeno idénticos denominados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno único. A su vez, el fragmento "F(ab')₂", que tiene dos sitios de unión a antígeno, se obtiene por tratamiento con pepsina.

Adicionalmente, el "fragmento" permite obtener otro tipo de fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab', fragmentos Fv monocatenario (scFv) o diacuerpos por medio de técnicas de ingeniería genética.

En una realización preferente, el anticuerpo anti-S100A4 específico o el fragmento del mismo es producido por el hibridoma ECACC 10022401.

La presente invención proporciona una secuencia aislada de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 1. Esta secuencia de aminoácidos abarca las FR y CDR de la cadena ligera de la región variable de un anticuerpo monoclonal dirigido contra S100A4. En particular, las secuencias de la cadena ligera de la región variable, así como las FR y CDR respectivos son los siguientes:

| SEQ ID NO. | Región | Secuencia |
|------------|--------|--|
| 1 | VL | DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQ KTGQSPPELLLIYKVS NRLSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAF DLGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKLEIK |
| 7 | FRL1 | DVLMTQTPLSLPVS LGDQASIS |

| | | |
|----|-------|----------------------------------|
| 8 | CDRL1 | RSSQSIVHSNGNTYLE |
| 9 | FRL2 | WYLQKTGQSPELLIY |
| 10 | CDRL2 | KVSNRLS |
| 11 | FRL3 | GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC |
| 12 | CDRL3 | FQGSHVPFT |
| 13 | FRL4 | FGSGTKLEIK |

La presente invención proporciona una secuencia aislada de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 2. Esta secuencia de aminoácidos abarca las FR y CDR de la cadena pesada de la región variable de un anticuerpo monoclonal dirigido contra S100A4 humana o murina. En particular, las secuencias de la cadena pesada de la región variable, así como las FR y CDR respectivos son los siguientes:

5

| SEQ ID NO. | Región | Secuencia |
|------------|--------|---|
| 2 | VH | EAQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIQETVMHWVKQRP |
| | | EQGLEWIGRIDPANGNTKDDPKFQGKASITVDTSSNTAYLQ |
| | | LSSLTSEDVAVYYCASSYAMDYWGQGTSVTVSS |
| 14 | FRH1 | EAQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIQ |
| 15 | CDRH1 | ETVMH |
| 16 | FRII2 | WVKQRPEQGLEWIG |
| 17 | CDRH2 | RIDPANGNTKDDPKFQG |
| 18 | FRH3 | KASITVDTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCAS |
| 19 | CDRH3 | SYAMDY |
| 20 | FRH4 | WGQGTSVTVSS |

Dichas secuencias se corresponden con el anticuerpo producido por el hibridoma ECACC 10022401. Por tanto, en una realización preferente, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende al menos una región VL que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 y al menos una región VH que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que mantiene sustancialmente la actividad antiangiogénica.

10 La expresión "región VL" se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo, mientras que la expresión "región VH" se refiere a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo.

La expresión "variante funcionalmente equivalente de la misma que mantiene sustancialmente la actividad antiangiogénica" se refiere a cualquier molécula que comparta con el anticuerpo de la invención, la función antiangiogénica, tanto *in vitro* como *in vivo* y que tiene una identidad mínima con la secuencia de aminoácidos. Las variantes funcionalmente equivalentes de los anticuerpos de la invención pueden derivar de dichas secuencias por medio de la inserción, sustitución o delección de uno o más aminoácidos y se pueden obtener por medios recombinantes y/o sintéticos.

Las variantes funcionalmente equivalentes de los anticuerpos de la divulgación deben conservar su capacidad para unirse al antígeno de S100A4 y también la capacidad para inhibir la función angiogénica de la proteína S100A4. Dicha función se puede verificar por medio de los procedimientos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, por medio del ensayo de migración endotelial con VEGF y S100A4 como se describe en el Ejemplo 9 de la presente solicitud.

Las variantes funcionalmente equivalentes de los anticuerpos de la divulgación incluyen polipéptidos que muestran al menos un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 72 %, un 74 %, un 76 %, un 78 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, un 99 % de identidad con las secuencias de polipéptidos mencionados anteriormente, preferentemente que tienen al menos un 90 % de identidad. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina utilizando algoritmos implementados en un ordenador y procedimientos ampliamente conocidos por personas expertas en la técnica. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S. y col., *NCBINLM NIH Bethesda*, Md. 20894, Altschul, S. y col., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215: 403-410). El grado de identidad se calcula de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección "Definiciones".

La presente divulgación proporciona una secuencia aislada de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 3. Este aminoácido se corresponde con el determinante antigénico o epítipo de S100 A4 humana o murina.

SEQ ID NO: 3 ELPSFLGKRT

En una realización de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 3.

En una realización de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une

específicamente a un polipéptido S100A4 humano o murino producido mediante la inmunización de un mamífero con un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 3.

5 En una realización de la presente invención, el anticuerpo o fragmento del mismo se selecciona entre un anticuerpo humano o un fragmento del mismo; un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo; un anticuerpo policlonal o un fragmento del mismo; un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo; un anticuerpo Fab y un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo.

En una realización de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende un polipéptido de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 1.

10 En una realización de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende un polipéptido de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2.

En una realización de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende regiones marco conservadas (FR) y regiones determinantes de complementariedad (CDR), en el que el anticuerpo monoclonal comprende una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2.

15 En una realización de la presente divulgación, el anticuerpo monoclonal se selecciona entre un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo.

En una realización de la presente divulgación, el anticuerpo monoclonal:

- a) reacciona solamente con una proteína S100A4 humana o murina, o
- b) bloquea un mecanismo de acción de una proteína S100A4 humana o murina, o
- 20 c) bloquea *in vitro* o *in vivo* la actividad funcional de una proteína S100A4 humana o murina, o
- d) bloquea un efecto promigratorio en las células endoteliales inducido por una proteína S100A4 humana o murina, o por una proteína S100A4 humana o murina combinada con VEGF, o
- e) bloquea el crecimiento tumoral, o
- f) bloquea el desarrollo del tumor, o
- 25 g) bloquea la angiogénesis tumoral, o
- h) bloquea la diseminación celular y establecimiento de metástasis, o
- i) bloquea procedimientos inflamatorios, o
- j) bloquea las células madre cancerosas, o
- k) cualquier combinación de las anteriores a) a j).

30 En una realización de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que comprende la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, en la que dicho anticuerpo o fragmento es monovalente o bivalente. La presente divulgación proporciona adicionalmente una estirpe celular de hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones presentadas en el presente documento.

35 La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo monoclonal obtenible por una estirpe celular de hibridoma depositada con el número de acceso 10022401 en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC).

En una realización de la presente divulgación, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID NO: 4 que codifica las FR y CDR de la cadena ligera de la región variable de un anticuerpo monoclonal.

40 SEQ ID NO: 4 1 GATGTTTTGA TGACCCAAAC TCCACTCTCC CTGCCTGTCA GTCTTGAGGA TCAAGCCTCC
61 ATCTCTTGCA GATCTAGTCA GAGTATTGTA CATAGTAATG GAAACACCTA TTTAGAATGG 121 TACCT-
GCAGA AAACAGGCCA GTCTCCAGAG CTCCTGATCT ACAAAGTTTC CAACCGACTC 181 TCTGGGGTCC CA-
GACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTAC ACTCAAGATC 241 AGCAGAGTGG AGGCTGAG-
GA TCTGGGAGTT TATTACTGCT TTCAAGGTTT ACATGTTCCA 301 TTCACGTTTC GCTCGGGGAC AAAGTT-
GGAA AAAAA

45 En una realización de la presente divulgación, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID NO: 5 que codifica las FR y CDR de la cadena pesada de la región variable de un anticuerpo monoclonal.

50 SEQ ID NO: 5 1 GAGGCTCAGC TGCAGCAGTC TGGGGCAGAG CTTGTGAAGC CAGGGGCCTC
TGTC AAGTTG
61 TCCTGCACAG CCTCTGGCTT CAACATTCAA GAGACCTATA TGCACTGGGT GAAGCAGAGG 121 CCT-
GAACAGG GCCTGGAGTG GATTGGAAGG ATTGATCCTG CGAATGGTAA TACCAAAGAT 181 GACCCGAAGT
TCCAGGGCAA GGCCTCTATA ACAGTAGACA CATCCTCAA CACAGCCTAC 241 CTGCAGCTCA GCAGCCT-
GAC ATCTGAGGAC ACTGCCGTCT ATTACTGTGC TTCAAGTTAT 301 GCTATGGACT ACTGGGGTCA AG-
GAACCTCA GTCACCGTCT CCTCA

En una realización de la presente divulgación, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID NO: 6 que codifica una región del epítipo de la proteína S100A4 humana.

55 SEQ ID NO: 6 GAGCTGCCAGCTTCTTGGGGAAAAGGACA

En otra realización preferente, el anticuerpo anti-S100A4 específico de la invención, o fragmento del mismo es producido por el hibridoma ECACC 11051801.

En otra realización preferente, el anticuerpo anti-S100A4 específico de la invención, o fragmento del mismo es producido por el hibridoma ECACC 11051802.

5 En otra realización preferente, el anticuerpo anti-S100A4 específico de la invención, o fragmento del mismo es producido por el hibridoma ECACC 11051803.

En otra realización preferente, el anticuerpo anti-S100A4 específico de la invención, o un fragmento del mismo es un anticuerpo producido por el hibridoma ECACC 11051804.

10 Los anticuerpos monoclonales del primer aspecto de la invención han demostrado que son capaces de detener la capacidad de migración de las células endoteliales humanas. Por tanto, en una realización particular, la divulgación se refiere a un anticuerpo anti-S100A4 específico que tiene actividad antiangiogénica o un fragmento del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo que es capaz de detener la capacidad de migración de las células endoteliales humanas.

15 "Detener la capacidad de migración de las células endoteliales humanas" se entiende como la inhibición de la capacidad de migración de dichas células por lo menos un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 99 %, un 100 %, preferentemente al menos un 20 %, más preferentemente al menos un 30 % y todavía más preferentemente al menos un 45 %. Dicha inhibición de la capacidad de migración o de detención de la migración se puede evaluar por medio de los ensayos descritos en el Ejemplo 9 de la presente invención.

20 La expresión "capacidad de migración de las células endoteliales humanas" se refiere a la capacidad de dichas células de moverse lo que es un paso clave en la formación de neovasculatura. Las células endoteliales humanas son células que revisten todos los vasos del organismo de un mamífero. Son células endoteliales humanas incluidas en dicha definición, sin limitación, las células humanas endoteliales de vena umbilical (HUVEC, por sus siglas en inglés). En una realización preferente, las células endoteliales humanas son células HUVEC.

25 **ESTIRPES CELULARES DE HIBRIDOMA Y PROCEDIMIENTO PARA OBTENER LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES DE LA INVENCION**

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para obtener un anticuerpo monoclonal de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende cultivar una estirpe celular de hibridoma seleccionada entre las estirpes celulares depositadas con el número de acceso ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 en condiciones que permiten la producción de dicho anticuerpo.

30 El procedimiento para obtener los anticuerpos monoclonales del primer aspecto de la invención puede realizarse de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica. Básicamente, el procedimiento consiste en el cultivo de la estirpe celular de hibridoma en un medio de cultivo adecuado para las células de hibridoma para producir anticuerpos y para secretarlos en el medio y posteriormente recoger el sobrenadante del medio de cultivo que contiene los anticuerpos monoclonales producidos. Dichos anticuerpos opcionalmente se pueden purificar por medios convencionales, tales como cromatografía de afinidad, proteína A sefarosa, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel o diálisis.

La expresión "anticuerpo monoclonal" ya se ha definido en el aspecto anterior.

40 "Cultivar" una estirpe celular de hibridoma se entiende como la incubación de las células de hibridoma en presencia de un medio adecuado en viales de cultivo durante el tiempo necesario y en las condiciones adecuadas para que tenga lugar la multiplicación de dichas células y la producción de los anticuerpos monoclonales de la invención. Dicho cultivo puede implicar el uso de medios de cultivo con diferentes composiciones. Preferentemente, en una primera etapa las células se cultivan en un medio que contiene suero para favorecer su multiplicación y, después de recoger las células y lavarlas, se cultivan en un medio sin suero para obtener anticuerpos. Los medios de cultivo adecuados para la obtención de los anticuerpos de acuerdo con este procedimiento son, sin limitación, DMEM/F12 complementado con L-glutamina y con suero fetal bovino a fin de favorecer la multiplicación celular; y una mezcla basada en el medio DMEM/F12 complementado con L-glutamina pero que carece de suero fetal bovino ("medio sin proteínas") como un medio de recogida de los anticuerpos. El medio para la producción de anticuerpos también podría consistir en cualquier medio o la mezcla de medios de cultivo celular sintéticos con una composición y complementación posterior que no incluye proteínas ("medio sin proteínas") o que dichas proteínas se encuentran en una proporción muy baja ("medio sin suero" o "medio bajo en proteínas") y que no pertenecen al grupo de las inmunoglobulinas. Dicho medio debe permitir el crecimiento celular y el mantenimiento, así como la secreción de anticuerpos por la estirpe celular de hibridoma anteriormente adaptada para crecer en ausencia de suero fetal bovino. En una realización preferente, el medio adecuado para el cultivo de dichas células es un medio que comprende DMEM/F12 y L-glutamina. Las condiciones en las que dicho cultivo se realizan son preferentemente en un ambiente húmedo y a una temperatura de 37 °C con atmósfera de aire normal o aire enriquecido con CO₂ al 5 %.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una estirpe celular de hibridoma seleccionada entre el grupo que consiste en una estirpe celular depositada con el número de acceso ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC

11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804. Preferentemente, la estirpe celular tiene el número de acceso ECACC 10022401. En otra realización, la estirpe celular de hibridoma se selecciona entre el grupo que consiste en una estirpe celular depositada con el número de acceso ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804.

5 La expresión "estirpe celular de hibridoma" se refiere a una estirpe celular formada por las células híbridas o hibridomas como se han definido anteriormente en el primer aspecto de la invención. Dicha estirpe celular de hibridoma se ha obtenido mediante metodologías convencionales como se describe en el Ejemplo 4 de la presente invención. Brevemente, se inmunizaron ratones con la proteína S100A4 recombinante humana y se extrajeron células del bazo del ratón inmunizado que se fusionaron con células de mieloma en presencia de un inductor de fusión, tal como PEG-1500. Los hibridomas se seleccionaron en medio HAT y cada clon seleccionado se subclonó mediante dilución límite. Los clones adecuados para la expansión se adaptaron al medio DMEM/F12 y se congelaron, constituyendo las estirpes celulares de hibridoma ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804.

15 En realizaciones preferentes de la invención, el anticuerpo monoclonal preparado por medio de este procedimiento puede ser cualquiera de los producidos por las estirpes celulares de hibridoma descritas en el contexto de la presente invención.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un procedimiento para la fabricación de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones presentadas en el presente documento, comprendiendo dicho procedimiento:

20 (i) la inmunización de un ratón con la proteína purificada S100A4 humana o murina o con la proteína purificada S100A4 humana o murina combinada con un agente eficaz para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno;
(ii) la producción de una o más células de hibridoma,
(iii) la selección de una o más células, cuyos sobrenadantes:

25 a) reaccionan solamente con una proteína S100A4 humana o murina, o
b) bloquean un mecanismo de acción de la proteína S100A4 humana o murina, o
c) bloquean *in vitro* o *in vivo* la actividad funcional de la proteína S100A4 humana o murina, o
d) bloquean un efecto promigratorio en las células endoteliales inducido por la proteína S100A4 humana o murina o por la proteína S100A4 humana o murina combinada con VEGF, o
30 e) bloquean el crecimiento tumoral, o
f) bloquean el desarrollo de tumores, o
g) bloquean la angiogénesis tumoral, o
h) bloquean la diseminación celular y el establecimiento metastásico, o
i) bloquean los procedimientos inflamatorios, o
35 j) bloquean las células madre cancerosas, o
k) cualquier combinación de las anteriores a) a j).

(iv) la producción de una estirpe celular específica de cualquiera de las células seleccionadas de la etapa iii); y
(v) el aislamiento del anticuerpo monoclonal a partir de dicha estirpe celular.

40 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE COMPRENDEN ANTICUERPOS ESPECÍFICOS ANTI-S100A4 DE LA INVENCION

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento de unión a S100A4 del mismo; preferentemente ECACC 10022401.

45 Como se utiliza en la presente invención, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una formulación que se ha adaptada para la administración de una dosis predeterminada de uno o varios agentes terapéuticos útiles a una célula, un grupo de células, un órgano, un tejido o un animal en el que existe una sobreexpresión de la proteína S100A4.

50 "Cantidad farmacéuticamente eficaz" se entiende como una cantidad capaz de proporcionar un efecto terapéutico y que puede determinarse por el experto en la materia por medio de técnicas de uso común.

Las composiciones de la divulgación pueden contener uno o más anticuerpos de acuerdo con el primer aspecto de la invención o uno o más fragmentos de los mismos que sustancialmente conserven la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo.

55 Las composiciones de la invención también pueden contener uno o varios compuestos adicionales para la prevención y/o el tratamiento de patologías en las que existe una sobreexpresión de la proteína S100A4, tales como el cáncer o enfermedades asociadas a la inflamación. Dichos compuestos adicionales tales como agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos, agentes antimetastásicos o agentes antiinflamatorios pueden formar parte de

la composición farmacéutica como entidades independientes de los anticuerpos monoclonales o también formando conjugados con dichos anticuerpos.

Las composiciones farmacéuticas se preparan por medios convencionales con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 5 Por "excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende una sustancia terapéuticamente inactiva que se dice que se usa para incorporar el ingrediente activo y que es aceptable para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico que lo fabrica desde un punto de vista físico/químico con respecto a la composición, formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad.

10 El número y la naturaleza de los excipientes farmacéuticamente aceptables dependen de la forma de dosificación deseada. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos por el experto en la materia (Faulí y Trillo C. (1993) "Tratado de Farmacia Galénica", Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid). Dichas composiciones se pueden preparar por medio de los procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica ("*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*", 20ª edición (2003) Genaro A.R., ed., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, EE.UU.).

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por cualquier tipo de vía adecuada, tal como por vía oral, vía tópica, por inhalación o vía parenteral de manera que se incluirán los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma de dosificación deseada. La vía preferida de administración de la composición farmacéutica es la vía endovenosa.

20 Por "vía oral" se entiende la composición farmacéutica incorporada en el organismo después de la deglución. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención puede estar en una forma de dosificación adecuada para su administración por vía oral, ya sea sólida o líquida. Las formas de dosificación adecuadas para su administración por vía oral pueden ser comprimidos, cápsulas, jarabes o soluciones y pueden contener cualquier excipiente convencional conocido en la técnica, tal como aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol o polivinilpirrolidona; agentes de carga, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para compresión, por ejemplo, estearato de magnesio; agentes disgregantes, por ejemplo almidón, polivinilpirrolidona, glicolato sódico de almidón o celulosa microcristalina; o agentes humectantes farmacéuticamente aceptables, tales como lauril sulfato de sodio. Las composiciones orales sólidas se pueden preparar por medio de procedimientos convencionales de mezcla, llenado o compresión. Se pueden utilizar operaciones repetitivas de mezcla para distribuir completamente el agente activo en las composiciones que emplean grandes cantidades de agentes de carga. Dichas operaciones son convencionales en la técnica. Los comprimidos se pueden preparar, por ejemplo, por medio de granulación húmeda o seca y opcionalmente recubriéndolos de acuerdo con los procedimientos conocidos en la práctica farmacéutica común, en particular con un recubrimiento entérico.

30 Por otra parte, por "vía tópica" se entiende una administración por vía no sistémica, e incluye la aplicación de una composición farmacéutica de la invención externamente en la epidermis, en la cavidad bucal y la instilación de dicha composición en los oídos, los ojos y la nariz y por la que no entra significativamente en la corriente en sangre. Por "vía sistémica" se entiende la administración por vía oral, vía intravenosa, vía intraperitoneal y vía intramuscular. La cantidad de anticuerpo requerido para el efecto terapéutico o profiláctico variará naturalmente de acuerdo con el anticuerpo elegido, la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se va a tratar y el paciente.

40 Por "inhalación" se entiende la administración por vía intranasal y por inhalación oral. Las formas de dosificación adecuadas para dicha administración, tales como una formulación en aerosol o un inhalador de dosis dosificada se pueden preparar por medio de técnicas convencionales.

Como se utiliza en el presente documento, el término "parenteral", incluye la administración por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea. Se prefieren generalmente las formas de dosificación subcutánea, intramuscular e intravenosa de administración parenteral.

45 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden adaptarse para su administración parenteral, tales como soluciones estériles, suspensiones o productos liofilizados en la forma de dosificación unitaria adecuada. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para su administración por vía intravenosa, algunos vehículos adecuados incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que sea fácil de inyectar. Debe ser estable en la preparación y las condiciones de almacenamiento y debe protegerse de la acción de contaminación de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, un poliol farmacéuticamente aceptable tal como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por medio del uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y por medio del uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede conseguir por medio de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol,

ácido ascórbico, timerosal y similares. En la mayoría de los casos, se preferirá incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser causada por la inclusión de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de los ingredientes mencionados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración a través de membranas estériles. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y el resto de los ingredientes requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de
10 polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son el secado al vacío y liofilización que dan lugar a un polvo con el ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada estéril de los mismos. El anticuerpo normalmente se almacenará en forma liofilizada o en solución. Las composiciones de anticuerpo terapéutico generalmente se encuentran en un envase que tiene una abertura de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de
15 solución intravenosa o un vial que tiene un adaptador que permite la recuperación de la formulación, tal como un tapón que puede perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica.

La composición farmacéutica puede administrarse adecuadamente por medio de infusión por pulsos, por ejemplo, con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente, la dosis se administra por medio de inyecciones, más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es aguda o
20 crónica.

En una realización, la composición farmacéutica que contiene el anticuerpo del primer aspecto de la invención se prepara con vehículos que protegerán a dicho anticuerpo de una eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas microencapsulados de administración. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como acetato de vinilo etileno, polianhídridos, ácido
25 poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para preparar dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse en el mercado en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals Inc.,

Las composiciones de liberación sostenida también incluyen preparaciones de cristales del anticuerpo suspendido en formulaciones adecuadas que pueden mantener los cristales en suspensión. Estas preparaciones, cuando se
30 inyectan por vía subcutánea o intraperitoneal pueden producir un efecto de liberación sostenida. Otras composiciones también incluyen anticuerpos atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen dichos anticuerpos se preparan mediante procedimientos conocidos tales como Epstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, (1980) 77: 4030-4034; documento EP 52.322, documento EP 36.676, documento EP 88.046, documento EP 143.949.

35 Las composiciones de la invención son adecuadas para la administración en cualquier tipo de mamífero, preferentemente un ser humano.

La presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal de acuerdo con el primer aspecto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un agente quimioterápico.

En otra realización de la presente invención, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un agente antiinflamatorio.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE COMPRENDEN ANTICUERPOS ESPECÍFICOS ANTI-S100A4 Y ANTIMETABOLITOS

45 Los autores han descubierto sorprendentemente que la combinación de anticuerpos específicos anti-S100A4 con un fármaco antimetabolito tienen un efecto citotóxico sinérgico en el tratamiento del cáncer (véase el ejemplo 15 de la presente invención). Por tanto, un aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-S100A4 específico que tiene actividad antiangiogénica o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo, en la que el anticuerpo se
50 selecciona entre el grupo que consiste en: (i) un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia ELPSFLGKRT (SEQ ID NO: 3), (ii) un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia EGFPDKQPRKK (SEQ ID NO: 24) y (iii) un anticuerpo producido por el híbrido ECACC 11051804 y un antimetabolito.

55 Como se usa en la presente invención, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una formulación que se ha adaptada para la administración de una dosis predeterminada de uno o varios agentes terapéuticos útiles a una célula, un grupo de células, un órgano, un tejido o un animal que padece cáncer.

La expresión "anticuerpo anti-S100A4 específico", en el contexto de este aspecto de la invención, se refiere a cualquier anticuerpo que reconoce específicamente la proteína S100A4.

60 "Antimetabolito", como se usa en el presente documento, se refiere, en un sentido amplio, a las sustancias que alteran el metabolismo normal y sustancias que inhiben el sistema de transferencia de electrones para evitar la producción de intermedios ricos en energía, debido a sus similitudes estructurales o funcionales con los metabolitos

que son importantes para organismos vivos (tales como vitaminas, coenzimas, aminoácidos y sacáridos).

Los antimetabolitos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, antimetabolitos de ácido fólico (aminopterina, denopterina, metotrexato, edatrexato, trimetrexato, nolatrexed, lometrexol, pemetrexed, raltitrexed, piritrexim, pteropterina, leucovorina, 10-propargil-5,8-dideazafolato (PDDF, CB3717)), análogos de purina (cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina, pentostatina, tioguanina) y análogos de pirimidina (capecitabina, citarabina o Ara-C, decitabina, fluorouracilo, 5-fluorouracilo, doxifluridina, floxuridina y gemcitabina). En una realización preferente, el antimetabolito se selecciona entre 5-fluorouracilo y gemcitabina, más preferentemente gemcitabina. Cuando el sujeto padece cáncer de colon la primera línea de tratamiento quimioterápico son antimetabolitos, preferentemente 5-fluorouracilo. Cuando el sujeto padece cáncer de páncreas, cáncer de vejiga o cáncer de la vesícula biliar el tratamiento quimioterápico de primera línea son antimetabolitos, preferentemente gemcitabina.

En una realización preferente, el anticuerpo combinado con el antimetabolito es un anticuerpo anti-S100A4 específico que tiene actividad antiangiogénica o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo en el que el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 15 (i) un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia ELPSFLGKRT (SEQ ID NO: 3),
- (ii) un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia EGFPDKQPRKK (SEQ ID NO: 24) y
- (iii) un anticuerpo producido por el hibridoma ECACC 11051804.

20 En una realización preferente, el anticuerpo de acuerdo con este aspecto es un anticuerpo monoclonal, preferentemente es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento de unión a S100A4 del mismo; más preferentemente ECACC 10022401.

25 Los autores han demostrado que una combinación de un anticuerpo anti-S100A4 y un antimetabolito es capaz de reducir la viabilidad de las células tumorales.

Por tanto, en una realización preferente, la composición es capaz de reducir la viabilidad de las células tumorales.

30 Por "reducir la viabilidad de las células tumorales" se entiende la reducción de la capacidad de las células para sobrevivir, crecer y multiplicarse por lo menos un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 99 %, un 100 %, preferentemente al menos un 60 %, aún más preferentemente al menos un 65 % y mucho más preferentemente al menos un 70 %. Dicha reducción de la viabilidad se puede evaluar mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 15 de la presente invención.

35 Por "célula tumoral" se entiende una célula maligna, también conocida como una célula cancerosa o cancerígena que crece y se divide más allá de los límites normales, que invade el tejido circundante y, a veces provoca metástasis. Las células tumorales que pueden tratarse con los anticuerpos de la presente invención son células que sobreexpresan la proteína S100A4. Dichas células incluyen células tumorales de estirpes celulares conocidas y establecidas y las células tumorales presentes en el organismo de un paciente que padece cáncer. Varios ejemplos ilustrativos no limitantes de líneas tumorales que sobreexpresan S100A4 son la estirpe tumoral de adenocarcinoma de colon Colo 205, la estirpe celular de adenocarcinoma pancreático humano MiaPACA-2, la estirpe celular de carcinoma pancreático humano Panel, la estirpe celular de adenocarcinoma de colon HCT116, las células madre cancerosas derivadas de un cultivo de la estirpe celular de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231. Son ejemplos ilustrativos, no limitativos, de las células tumorales presentes en un paciente que padece cáncer y que sobreexpresan S100A4 células tumorales de carcinoma de mama (Rudland PS y col. *Cancer Res.* 2000; 60 (6): 1595-1603), carcinoma de próstata (Saleem M y col. *PNAS.* 2006; 103 (40): 14825-30), carcinoma de pulmón (Tsuna M y col. *Anticancer Res.* 2009; 29 (7): 2547-54), carcinoma colorrectal (Cho Y y col. *World J Gastroent.* 2005; 11 (31): 4852-6), carcinoma pancreático (Rosty C y col. *Am J Pathol.* 2002; 160 (1): 45-50), carcinoma renal (Bandiera A y col. *World J Surg.* 2009; 33 (7): 1414-1420), carcinoma gástrico (Yonemura Y y col. *Clin Cancer Res.* 2000; 6 (II): 4234-42), carcinoma de ovario (Maelandsmo GM y col. *Tumor Biol.* 2009; 30 (1): 15-25), carcinoma papilar de tiroides (Min HS y col. *Mod Pathol.* 2008; 21 (6): 748-55), melanoma (Andersen K y col. *Mod Pathol.* 2004; 17 (8): 990-997), carcinoma hepatocelular (Cui J y col. *J Can Res Clin Oncol.* 2004; 130 (10): 615-22), carcinoma de vejiga (Agerbaek M y col. 2006 *Eur. Urol.* 50 (4): 777-785), liposarcoma invasivo (Pazzaglia L y col. *Anticancer Res.* 2004; 24 (2B): 967-972), neuroblastoma (Bjomland K y col. *J Pediatr Surg.* 2001; 36 (7): 1040-1044), carcinoma escamoso esofágico (Ninomiya I y col. *Int J Oncol.* 2001; 18 (4): 715-20), osteosarcoma (Mathisen B y col. *Clin Exp Metastasis.* 2003; 20 (8): 701-11), carcinoma de la vesícula biliar (Nakamura T y col. *Int J Oncol.* 2002; 20 (5): 937-41), carcinoma escamoso oral (Moriyama-Kita M y col. *Oral Oncol* 2004; 40 (5): 496-500), carcinoma endometrial (Xie R y col. *Lab Invest.* 2009; 89 (8): 937-47) y meduloblastoma (Heman R y col. *Cancer Res.* 2003; 63 (1): 140-148), entre otros.

Las células tumorales que expresan la proteína S100A4 pueden identificarse por medio de procedimientos convencionales tales como ELISA o transferencia Western, de acuerdo con el procedimiento que se describe en la presente invención.

En una realización, las células tumorales cuya viabilidad se reduce por medio de los anticuerpos de dicho aspecto de la invención son células tumorales de cáncer de páncreas o de cáncer de colon, preferentemente de cáncer de páncreas.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-S100A4 específico de acuerdo con la invención y un metabolito para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer o metástasis.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-S100A4 específico de acuerdo con la invención y un metabolito para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de cáncer o metástasis.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención de cáncer o metástasis en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-S100A4 específico de acuerdo con la invención y un metabolito.

Los términos "prevención", "tratamiento", "cáncer" y "metástasis" se definen en el contexto de los usos terapéuticos de los anticuerpos de la invención.

15 Todas las realizaciones particulares de los aspectos anteriores son aplicables a dichos aspectos.

USOS TERAPÉUTICOS DE LOS ANTICUERPOS DE LA INVENCION

Angiogénesis y cáncer

20 La presente divulgación proporciona adicionalmente un anticuerpo o un fragmento del mismo o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones presentadas en el presente documento, para su uso como medicamento.

La presente divulgación también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones presentadas en el presente documento, para su uso como medicamento para el tratamiento de tumores.

25 La presente divulgación también proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento del mismo o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones presentadas en el presente documento, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumores.

30 La presente divulgación también proporciona un procedimiento para el tratamiento de tumores que comprende la administración a un sujeto que necesite de dicho tratamiento de una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones presentadas en el presente documento.

Los anticuerpos anti-S100A4 capaces de unirse específicamente a la proteína S100A4 tienen una aplicación en aquellas enfermedades en las que dicha proteína se sobreexpresa.

Específicamente, la proteína S100A4 se expresa, como se ha descrito anteriormente, en una amplia diversidad de cánceres.

35 Como resultado, los ligandos de la proteína S100A4 y, más específicamente, los anticuerpos específicos contra esta proteína son fármacos candidatos para usarse en la terapia para el tratamiento de dicha enfermedad. Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre metástasis y una enfermedad donde se produce angiogénesis patógena. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre metástasis y una enfermedad donde se produce angiogénesis patógena.

45 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada entre metástasis y una enfermedad asociada a una angiogénesis no deseada en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Los términos "anticuerpo" y "fragmento" se han definido previamente en el contexto del primer aspecto de la invención.

50 Por "prevención" se entiende la administración de un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o de un medicamento que lo contiene en una etapa inicial o temprana de la enfermedad, o también para prevenir su aparición.

55 El término "tratamiento" se usa para designar la administración de un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención o de un medicamento que lo contiene para controlar la progresión de la enfermedad antes o después de que los signos clínicos hayan aparecido. El control de la progresión de la enfermedad se entiende como los resultados clínicos beneficiosos o deseados que incluyen, pero no se limitan a, la reducción de los síntomas, la reducción de la duración de la enfermedad, la estabilización de las afecciones patológicas (específicamente evitar un deterioro adicional), el retraso de la progresión de la enfermedad, la mejora del estado patológico y la remisión (tanto parcial como completa). El control de la progresión de la enfermedad

también implica una prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si el tratamiento no se aplicó.

Por "medicamento" se entiende una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

5 Por el término "metástasis" se entiende la propagación a distancia, fundamentalmente por el torrente en sangre o linfático, de las células que causan el cáncer y el crecimiento de nuevos tumores en los sitios de destino de dicha metástasis.

En el contexto de la presente invención, por "angiogénesis" se entiende el proceso fisiológico que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes. La angiogénesis es también conocida como neovascularización.

La expresión "enfermedades asociadas a una angiogénesis no deseada" se refiere a todas aquellas enfermedades en las que tiene lugar una angiogénesis patógena, es decir, cuando dicho procedimiento es perjudicial o indeseable, ya sea canceroso o no. El ámbito de la presente invención excluye, por tanto, el tratamiento de la angiogénesis en situaciones en las que es necesaria, tales como la cicatrización de heridas. Las enfermedades asociadas a una angiogénesis no deseada que se pueden tratar con los compuestos de acuerdo con la presente invención, sin limitación, son enfermedades inflamatorias, especialmente enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide, psoriasis, sarcoidosis y otras similares, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades virales, enfermedades genéticas, enfermedades alérgicas, enfermedades bacterianas, enfermedades oftalmológicas tales como retinopatía diabética, retinopatía prematura, retinopatía atrial proliferativa, oclusión venosa de la retina, degeneración macular, degeneración macular senil discoide, glaucoma neovascular ocular, enfermedades coroideas con neovascularización, enfermedades de la retina con neovascularización, rubeosis (neovascularización angular), rechazo del injerto de córnea, fibroplasia retrolental, queratoconjuntivitis epidérmica, deficiencia de vitamina A, agotamiento de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, ojo seco pterigio, síndrome de Sjögren, acné rosácea, flictenulosis, sífilis, infecciones micobacterianas, degeneración lipídica, quemaduras con sustancias corrosivas, úlceras bacterianas, úlceras micóticas, infecciones protozoarias, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración de Terrien marginal, queratólisis marginal, escleritis, desprendimiento crónico de retina y similares, aterosclerosis, endometriosis, obesidad, insuficiencia cardíaca; insuficiencia renal avanzada; endotoxemia; síndrome de choque tóxico, meningitis, fibrosis inducida por silicio; fibrosis inducidas por amianto, ictus, periodontitis, gingivitis, anemia macrocítica, anemia refractaria, síndrome de delección 5q, las condiciones en que se modifique la vascularización tales como la infección por el VIH, la hepatitis, la telangiectasia hemorrágica o la enfermedad de Rendu-Osler-Weber.

En una realización preferente, la enfermedad asociada a una angiogénesis no deseada es una enfermedad seleccionada entre cáncer, artritis reumatoide, psoriasis, sarcoidosis, retinopatía diabética, retinopatía prematura, oclusión venosa de la retina, degeneración macular discoide senil, aterosclerosis, endometriosis y obesidad; preferentemente el cáncer.

En una realización particular, las enfermedades asociadas a una angiogénesis no deseada son las enfermedades inflamatorias. Por "enfermedad inflamatoria" se entiende cualquier enfermedad donde hay una respuesta inflamatoria excesiva o alterada que conduce a los síntomas inflamatorios. Dichas enfermedades inflamatorias que se pueden tratar por los compuestos de la invención incluyen, sin limitación, enfermedad de Addison, el acné vulgar, la alopecia areata, la amiloidosis, la espondilitis anquilosante, ulceraciones, estomatitis añosa, artritis, arteriosclerosis, artrosis, artritis reumatoide, asma bronquial, enfermedad de Bechet, la enfermedad de Boeck, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, coroiditis, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, la crioglobulinemia, la degeneración macular, la dermatitis, la dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes dependiente de la insulina, la diabetes juvenil, la enfermedad inflamatoria desmielinizante, contractura de Dupuytren, encefalomielititis, la encefalomielititis alérgica, endoftalmia, enteritis alérgica, síndrome de enteropatía autoinmunitaria, eritema nudoso leproso, la espondilitis anquilosante, la parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, la fibrosis quística, la glomerulonefritis, gingivitis, síndrome de Goodpasture, síndrome Graves, enfermedad de Hashimoto, la hepatitis crónica, la histiocitosis, ileítis regional, iritis, lupus eritematoso diseminado, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso cutáneo, linfogranuloma, mononucleosis infecciosa, miastenia grave, mielitis transversa, mixedema primario idiopático, nefrosis, obesidad, oftalmía simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, paniculitis, el pénfigo vulgar, la periodontitis, la poliarteritis nodosa, poliartritis crónica, polimiositis, polirradiculitis aguda, psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, púrpura, pioderma gangrenosa, síndrome de Reiter, la retinopatía diabética, rosácea, sarcoidosis, esclerosis atáxica, esclerosis sistémica progresiva, escleritis, esclerodermia, esclerosis múltiple, esclerosis diseminada, uveítis aguda anterior, vitíligo, enfermedad de Whipple, enfermedades asociadas al SIDA, inmunodeficiencia combinada grave y el virus de Epstein Barr, tales como el síndrome de Sjögren, la tuberculosis osteoarticular y enfermedades parasitarias tales como leishmaniosis. Las enfermedades inflamatorias preferidas son artritis reumatoide, psoriasis, sarcoidosis, retinopatía diabética, degeneración macular, arteriosclerosis y obesidad.

En otra realización preferente, la enfermedad es cáncer.

60 Los términos "cáncer" y "tumor" se refieren a la afección fisiológica de los mamíferos que se caracteriza por un crecimiento celular desregulado. Los anticuerpos o un fragmento de estos que se unen específicamente a la proteína S100A4 del primer aspecto de la invención son útiles para el tratamiento de cualquier tipo de cáncer o tumor, tal

como sin limitación, tumor mamario, corazón, pulmonar, de intestino delgado, colon, esplénico, renal, vejiga, cabeza, cuello, ovárico, prostático, cerebral, pancreático, piel, óseo, médula ósea, en sangre, tímico, uterino, testicular y hepático. En particular, los tumores que pueden tratarse con dichos anticuerpos incluyen, sin limitación, adenoma, angiosarcoma, astrocitoma, carcinoma epitelial, germinoma, glioblastoma, glioma, hemangioendotelioma, hemangiosarcoma, hematoma, hepatoblastoma, leucemia, linfoma, meduloblastoma, melanoma, neuroblastoma, osteosarcoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma y teratoma. En particular, el tumor o cáncer se selecciona entre el grupo de melanoma acral lentiginoso, queratosis actínica, adenocarcinoma, carcinoma cístico adenoideo, adenomas, adenosarcomas, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de la glándula de Bartolino, carcinoma de célula basal, carcinoma de glándula bronquial, carcinoide capilar, carcinoma, carcinosarcoma, colangiosarcoma, cistoadenoma, tumor del saco vitelino, hiperplasia de endometrio, sarcoma del estroma endometrial, adenocarcinoma endometrioide, sarcoma ependimario, sarcoma de Swing, hiperplasia focal nodular, tumores de estirpe germinal, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastoma, hemangioendotelioma, hemangioma, adenoma hepático, adenomatosis hepática, carcinoma hepatocelular, insulinooma, neoplasia intraepitelial, neoplasia interepitelial de célula escamosa, carcinoma invasivo de célula escamosa, carcinoma de células grandes, leiomyosarcoma, melanoma, melanoma maligno, tumor mesotelial maligno, meduloblastoma, meduloepitelioma, carcinoma mucoepidermoide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, osteosarcoma, adenocarcinoma seroso papilar, tumor pituitario, plasmacitoma, pseudosarcoma, blastema pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma de célula pequeña, carcinoma de tejido blando, tumor secretor de somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de célula escamosa, carcinoma indiferenciado, melanoma uveal, carcinoma verrugoso, vipoma, tumor de Wilm. En una realización de la presente invención, el tumor se selecciona entre el grupo que consiste en: carcinoma de mama, carcinoma de próstata, carcinoma de pulmón, carcinoma colorrectal, carcinoma pancreático, carcinoma renal, carcinoma gástrico, carcinoma de ovario, carcinoma papilar de tiroides, melanoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de vejiga, liposarcoma, carcinoma invasivo, neuroblastoma, carcinoma escamoso esofágico, osteosarcoma, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma escamoso oral, carcinoma de endometrio y meduloblastoma. En otra realización, el tumor se selecciona entre el carcinoma colorrectal, el carcinoma de páncreas y cualquier otro tumor mediado por S100A4.

En una realización preferente de la invención, el tumor o cáncer que se ha de prevenir o tratar con dichos anticuerpos se selecciona entre el cáncer pancreático y el cáncer colorrectal, preferentemente el cáncer pancreático.

La expresión "cáncer pancreático" se entiende como cualquier neoplasia maligna de páncreas, incluyendo el adenocarcinoma y algunas de sus variantes.

La expresión "cáncer colorrectal" se entiende como un cáncer que se caracteriza por una neoplasia en el colon, recto o el apéndice vermiforme. El cáncer colorrectal es clínicamente distinto del cáncer anal que afecta al ano.

En otra realización de la presente invención, el medicamento comprende uno o más anticuerpos de acuerdo con el primer aspecto de la invención como único agente terapéutico. Sin embargo, el medicamento de la invención además puede contener uno o varios compuestos adicionales para el tratamiento del cáncer. Por tanto, en otra realización de la presente invención, el medicamento se prepara para la administración combinada de un anticuerpo de acuerdo con la invención y uno o más agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de dicha enfermedad.

La expresión "agente terapéutico útil para el tratamiento de dicha enfermedad" se refiere a un agente adecuado para su uso para el tratamiento del cáncer.

Para el tratamiento del cáncer, el anticuerpo de la invención puede usarse en combinación con un compuesto adicional terapéuticamente activo, tal como un agente citotóxico, un agente antiangiogénico o un agente antimetastásico.

Los agentes citotóxicos que pueden utilizarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento del cáncer incluyen pero sin limitación, antibióticos antracíclicos tales como la doxorubicina y la daunorubicina, taxanos tales como el Taxol™ y el docetaxel, alcaloides de la vinca tales como la vincristina y la vinblastina, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, irinotecán, idarrubicina, mitomicina C, oxaliplatino, raltitrexed, tamoxifeno, cisplatino, carboplatino, metotrexato, actinomicina D, mitoxantrona, blenoxano o mitramicina. Los agentes antiangiogénicos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento del cáncer incluyen pero sin limitación un agente antiangiogénico seleccionado entre el grupo del paclitaxel, 2-metoxiestradiol, prinomastat, batimastat, BAY 12-9566, carboxiamidotriazol, CC-1088, ácido acético dextrometorfano, ácido acético dimetilxantenona, endostatina, IM-862, marimastat, pencicilamina, PTK787/ZK 222584, RPI.4610, lactato de escualamina, SU5416, talidomida, combretastatina, tamoxifeno, COL-3, neovastat, BMS-275291, SU6668, anticuerpos anti-VEGF, Medi-522 (Vitaxin II), CAI, interleucina 12, IM862, amilorida, angiostatina, KI-3 angiostatina, KI-5 angiostatina, Captopril, DL-alfa-difluorometilomitina, DL-alfa-difluorometilomitina HCl, endostatina, fumagillina, herbimicina A, 4-hidroxiifenilretinamida, juglona, laminina, hexapéptido de laminina, pentapéptido de laminina, lavendustina A, medroxiprogesterona, minociclina, inhibidor de la ribonucleasa de placenta, suramina, trombospondina, anticuerpos dirigidos contra factores proangiogénicos (por ejemplo, Avastin, Erbitux, Vectibix, Herceptin); inhibidores de tirosina cinasa de bajo peso molecular de factores de crecimiento proangiogénicos (por ejemplo Tarceva, Nexavar, Sutent, Iressa); inhibidores de mTOR (por ejemplo Torisel);

interferón alfa, beta y gamma, IL-12, inhibidores de metaloproteinasas de matriz extracelular, (por ejemplo, COL3, marimastat, batimastat); ZD6474, SU11248, vitaxina; inhibidores de PDGFR (por ejemplo Gleevec); NM3 y 2-ME2; ciclopéptidos como el cilengitida. Agentes antimetastásicos que pueden utilizarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento del cáncer incluyen pero sin limitación cualquier agente capaz de actuar como un agente antimetastásico, tales como los agentes alquilantes; antimetabolitos como el 5-fluorouracilo, pemetrexed (MTA), raltitrexed (TDX); agentes citotóxicos basados en platino como el cisplatino o el oxaliplatino; inhibidores de topoisomerasas; agentes antimicrotúbulos; antraciclina; alcaloides de plantas; inhibidores de GTPasas; inhibidores de la angiogénesis; inhibidores de metaloproteinasas de matriz extracelular; inhibidores de cinasas reguladoras del ciclo celular, como las cinasas dependientes de ciclinas e inhibidores de ciclinas; inhibidores de la vía de señalización de Wnt; inhibidores del factor de transcripción E2F; inhibidores de las deacetilasas de histonas; inhibidores de la cinasa AKT o inhibidores de ATPasas.

Por "administración combinada" se entiende que el anticuerpo de acuerdo con la invención puede administrarse conjuntamente o por separado, simultáneamente, al mismo tiempo o de manera secuencial con un agente terapéutico útil para el tratamiento del cáncer en cualquier orden posible. Por ejemplo, la administración del anticuerpo de la invención puede realizarse en primera instancia, seguido por la administración de uno o más agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de dicha patología; o bien la administración del anticuerpo de la invención puede realizarse en última instancia, precedida por la administración de uno o más agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de dicha patología; o bien la administración del anticuerpo de la invención puede realizarse al mismo tiempo que la administración de uno o más agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de dicha patología.

Un experto en la materia entenderá que, en el contexto de la presente invención, el medicamento para la administración combinada de un anticuerpo de acuerdo con la invención y un agente terapéutico adicional útil para el tratamiento del cáncer puede prepararse como una forma de dosificación única o en formas de dosificación separadas.

En una realización preferente, el anticuerpo específico anti-S100A4 con actividad antiangiogénica es un anticuerpo monoclonal, preferentemente un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 and ECACC 11051804; más preferentemente producido por el hibridoma ECACC 10022401. En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-S100A4 específico o un fragmento del mismo producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento del mismo para su uso en medicina.

La presente divulgación también proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones que se presentan en el presente documento, para su uso como medicamento para el tratamiento de cualquier enfermedad mediada por S100A4.

La presente divulgación también proporciona el uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones que se presentan en el presente documento, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades mediadas por S100A4.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento para el tratamiento de enfermedades mediadas por S100A4 que comprende la administración a un sujeto que necesite de dicho tratamiento de una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo o un fragmento del mismo o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se presentan en el presente documento.

Inflamación

Los inventores han descubierto que anticuerpos específicos anti-S100A4 son útiles en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades asociadas a la inflamación. Por tanto, un aspecto de la divulgación se refiere al uso de un anticuerpo que se une específicamente a la proteína S100A4 o de un fragmento de unión a S100A4 del mismo con capacidad para unirse al antígeno para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada con inflamación.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a la proteína S100A4 o de un fragmento de unión a S100A4 del mismo con capacidad para unirse al antígeno para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada con inflamación.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con inflamación en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un anticuerpo que se une específicamente a la proteína S100A4 o de un fragmento de unión a S100A4 del mismo con capacidad de unión al antígeno.

La expresión "anticuerpo que se une específicamente a la proteína S100A4", en el contexto de este aspecto de la invención, se refiere a cualquier anticuerpo que reconozca específicamente la proteína S100A4 y no otras proteínas de la familia de las S100. Dicha expresión incluye anticuerpos desvelados anteriormente en el estado de la técnica. El término "fragmento" se refiere a un fragmento del anticuerpo que tiene capacidad de unirse al antígeno. No es

necesario que dicho fragmento tenga actividad antiangiogénica.

La expresión “enfermedad asociada con inflamación” se refiere a todas aquellas enfermedades donde la inflamación patológica tiene lugar, es decir, cuando dicho procedimiento es dañino o indeseable, ya sea canceroso o no. Las enfermedades asociadas a la inflamación incluyen enfermedades inflamatorias, donde se produce una respuesta inflamatoria excesiva o está alterada que conduce a síntomas de inflamación. Dichas enfermedades inflamatorias que podrían tratarse con los anticuerpos de la invención incluyen sin limitación, enfermedad de Addison, acné común, alopecia areata, amiloidosis, espondilitis anquilosante, ulceraciones, estomatitis aftosa, artritis, arteriosclerosis, osteoartritis, artritis reumatoide, asma bronquial, síndrome de Bechet, enfermedad de Boeck, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, coroiditis, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, crioglobulinemia, degeneración macular, dermatitis, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes dependiente de insulina, diabetes juvenil, enfermedad inflamatoria desmielinizante, contractura de Dupuytren, encefalomiелitis, encefalomiелitis alérgica, endoftalmia, enteritis alérgica, síndrome de enteropatía autoinmune, eritema nodoso leproso, espondilitis anquilosante, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, fibrosis quística, gingivitis, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, síndrome de Graves, enfermedad de Hashimoto, hepatitis crónica, histiocitosis, ileítis regional, iritis, lupus eritematoso disseminado, lupus sistémico eritematoso, lupus eritematoso cutáneo, linfogranuloma, mononucleosis infecciosa, miastenia grave, mielitis transversa, mixedema primario idiopático, nefrosis, obesidad, oftalmía simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, panniculitis, pénfigo común, periodontitis, poliarteritis nodosa, poliartrosis crónica, polimiositis, polirradiculitis aguda, psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, púrpura, pioderma gangrenoso, síndrome de Reiter, retinopatía diabética, rosácea, sarcoidosis, esclerosis atáxica, esclerosis sistémica progresiva, escleritis, esclerodermia, esclerosis múltiple, esclerosis disseminada, uveítis anterior aguda, vitiligo, enfermedad de Whipple, enfermedades asociadas al SIDA, inmunodeficiencia combinada severa y virus de Epstein-Barr tales como el síndrome de Sjögren, la tuberculosis osteoarticular y enfermedades parasitarias como la leishmaniosis. Las enfermedades inflamatorias preferidas son la artritis reumatoide, la arteriosclerosis, la psoriasis, la enfermedad inflamatoria intestinal y la enfermedad de injerto contra huésped. Los términos “medicamento”, “prevención” y “tratamiento” se definen en el contexto de los usos terapéuticos de los anticuerpos de la invención.

En una realización preferente, el anticuerpo que se une específicamente a la proteína S100A4 o a un fragmento de la misma es un anticuerpo anti-S100A4 con actividad antiangiogénica o un fragmento del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo en el que el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en:

- (i) Un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia ELPSFLGKRT (SEQ ID NO: 3),
- (ii) Un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia EGFPDKQPRKK (SEQ ID NO: 24) y
- (iii) Un anticuerpo producido por el hibridoma ECACC 11051804.

En una realización más preferente, el anticuerpo es producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804; más preferentemente el hibridoma es ECACC 10022401.

CONJUGADOS DE LOS ANTICUERPOS DE LA INVENCION Y SUS USOS

Dado que los anticuerpos del primer aspecto de la invención son capaces de unirse a la proteína S100A4 y que esta proteína esta sobreexpresada en el cáncer, el anticuerpo específico anti-S100A4 con capacidad antiangiogénica o un fragmento de unión a S100A4 del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención constituyen agentes adecuados para llevar compuestos con actividad terapéutica hacia sitios de expresión de S100A4.

La proteína S100A4 se expresa, como se ha detallado anteriormente, en una gran diversidad de cánceres. Dicha proteína también se expresa en enfermedades asociadas a la inflamación tales como la artritis reumatoide.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención y un segundo componente seleccionado entre el grupo de:

- a) un agente antiangiogénico,
- b) un agente antimetastásico,
- c) un agente citotóxico,
- d) un agente antiinflamatorio

En una realización preferente el segundo componente se selecciona entre el grupo de: a) un agente antiangiogénico, b) un agente antimetastásico y c) un agente citotóxico.

“Conjugado” en el contexto de la presente invención se como un conjunto formado por un anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la invención unido, enlazado o asociado a, al menos, un segundo componente.

Los anticuerpos o un fragmento de los mismos de acuerdo con el primer aspecto de la invención se han descrito en el contexto del primer aspecto.

“Segundo componente” se entiende como una molécula con actividad terapéutica que se dirige hacia su sitio de acción mediante el anticuerpo monoclonal de la invención.

La proteína S100A4 se sobreexpresa en células tumorales. Por tanto, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para dirigir fármacos antitumorales hacia sitios de expresión.

Como se utiliza en la presente invención, la expresión "agente citotóxico" se refiere a un agente que es capaz de promover la muerte celular y que tiene la capacidad de reducir el crecimiento, parar el crecimiento o destruir las células y, en particular, las células de proliferación rápida y, aún más en particular, células tumorales. La muerte celular puede ser causada por cualquier mecanismo, tales como por ejemplo apoptosis, aunque no se limita a esta causa, mediante la inhibición metabólica, la interferencia con la organización del citoesqueleto o modificaciones químicas del ADN. El término agente citotóxico comprende cualquier agente quimioterápico incluyendo moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, oligonucleótidos y similares; toxinas; enzimas; citocinas; radioisótopos o agentes radioterapéuticos.

Por "agentes quimioterápicos" se entienden compuestos químicos tales como, sin limitación, antibióticos antracíclicos tales como la doxorubicina y la daunorubicina, taxanos tales como el Taxol™ y el docetaxel, alcaloides de la vinca tales como la vincristina y la vinblastina, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, irinotecán, idarubicina, mitomicina C, oxaliplatino, raltitrexed, tamoxifeno, cisplatino, carboplatino, metotrexato, actinomicina D, mitoxantrona, blenoxano o mitramicina, antimetabolitos tales como la gemcitabina.

"Toxina" se entiende como un agente tóxico que se conjuga con el anticuerpo de la invención formando una inmunotoxina. La conjugación de determinadas toxinas con anticuerpos reduce la toxicidad de estas, permitiendo su uso como agentes terapéuticos, porque de lo contrario serían demasiado tóxicos. La unión entre la toxina y el anticuerpo se realiza químicamente, conservando su actividad biológica. Su separación generalmente sucede en los lisosomas de las células diana reconocidas por el anticuerpo de manera que la citada unión química solo se rompe en el entorno ácido celular cerrado de los lisosomas. Las toxinas útiles en el contexto de la presente invención son las toxinas de plantas, toxinas bacterianas, toxinas fúngicas o de origen animal o un fragmento de las mismas, tales como, sin limitación, la cadena A de la ricina, la saponina, la cadena A de la difteria, fragmentos de la toxina diftérica activos no enlazantes, cadena A de la exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, cadena A de la abrina, cadena A de la modicina, α -sarcina, proteínas A de *Leurites fordii*, proteína diantina, proteínas (PAPI, PAPII y PAP-S) de *Phytolaca americana*, inhibidor de *Momordica charanda*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos.

Por "enzimas" se entienden en el contexto de la presente invención enzimas activadoras de toxinas o fármacos, tales como, sin limitación, fosfatasa alcalina que activa el etopósido y la doxorubicina; carboxipeptidasa G2 que activa las mostazas nitrogenadas; beta-lactamasa que activa la doxorubicina, el paclitaxel y la mitomicina.

Por "citocinas" se entienden péptidos de diferentes tamaños y pesos moleculares que son sintetizadas por las células del sistema inmunitario con el fin de regular la respuesta inmunitaria y estas pueden ser hormonas, factores de crecimiento, factores de necrosis, etc. Estas pueden ser de orígenes naturales o procedentes de cultivos celulares recombinantes y equivalentes activos biológicamente a la secuencia de las citocinas naturales. Su conjugación con anticuerpos da lugar a las inmunocitocinas. Las citocinas útiles en la presente invención son, sin limitación, TNF-alfa, IFN-gamma, factor GM-GFS o IL-2.

Por "radioisótopos" se entienden isótopos radioactivos tales como, sin limitación, ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{67}Cu , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{125}I , ^{111}In .

Por "agente antiangiogénico" se entiende una sustancia química o biológica que inhibe o reduce la formación de nuevos vasos sanguíneos, es decir, la angiogénesis. Los ejemplos de agentes antiangiogénicos que pueden conjugarse con anticuerpos del primer aspecto de la invención, incluyen, sin limitación, un agente antiangiogénico seleccionado entre el grupo de paclitaxel, 2-metoxiestradiol, primomastat, batimastat, BAY 12-9566, carboxiamidotriazol, CC-1088, ácido dextrometorfano acético, ácido dimetilxantenona acético, endostatina, IM-862, marimastat, penicilamina, PTK787/ZK 222584, RPI.4610, lactato de escualamina, SU5416, talidomida, combretastatina, tamoxifeno, COL-3, neovastat, BMS-275291, SU6668, anticuerpos anti-VEGF, Medi-522 (Vitaxin II), CAI, interleucina 12, IM862, amilorida, angiostatina, angiostatina KI-3, angiostatina KI-5, Captopril, DL-alfa-difluorometilomitina, DL-alfa-difluorometilomitina HCl, endostatina, fumagillina, herbimicina A, 4-Hidroxifenilretinamida, juglona, laminina, hexapéptido de laminina, pentapéptido de laminina, lavendustina A, medroxiprogesterona, minociclina, inhibidor de la ribonucleasa de placenta, suramina, trombospondina, anticuerpos dirigidos contra factores proangiogénicos (por ejemplo, Avastin, Erbitux, Vectibix, Herceptin); inhibidores de tirosina cinasa de bajo peso molecular de factores de crecimiento proangiogénicos (por ejemplo, Tarceva, Nexavar, Sutent, Iressa); inhibidores de mTOR (por ejemplo, Torisel); interferón alfa, beta y gamma, IL-12, inhibidores de metaloproteinasas de matriz extracelular (por ejemplo, COL3, marimastat, batimastat); ZD6474, SU11248, vitaxina; inhibidores de PDGFR (por ejemplo Gleevec); NM3 y 2-ME2; ciclopéptidos tales como cilengitida.

Por "agente antimetastásico" se entiende una sustancia química o biológica que inhibe o reduce la metástasis, es decir, la propagación distante, fundamentalmente mediante el torrente linfático o en sangre, de células que causan cáncer y el crecimiento de nuevos tumores en sitios de destino de dicha metástasis.

Los agentes antimetastásicos pueden conjugarse con anticuerpos del primer aspecto de la invención e incluyen, sin limitación, cualquier agente citotóxico capaz de actuar como un agente antimetastásico, tales como, los agentes

alquilantes; antimetabolitos tales como el 5-fluorouracilo, perimetrexed (MTA), raltitrexed (TDX); agentes citotóxicos basados en platino tales como el cisplatino o el oxaliplatino; inhibidores de topoisomerasas; agentes antimicrotúbulos; antraciclinas; alcaloides de plantas; inhibidores de GTPasas; inhibidores de la angiogénesis; inhibidores de metaloproteinasas de matriz extracelular; inhibidores de cinasas reguladoras del ciclo celular, tales como las cinasas dependientes de ciclinas e inhibidores de ciclinas; inhibidores de la vía de señalización de Wnt; inhibidores del factor de transcripción E2F; inhibidores de las deacetilasas de histonas; inhibidores de la cinasa AKT o inhibidores de ATPasas.

Los conjugados del anticuerpo con otros agentes pueden crearse utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento o engarces proteicos bifuncionales. El engarce puede ser un "engarce desmontable" que permita la liberación del agente en la célula, tal como un engarce lábil en medio ácido, un engarce sensible a peptidasas, un engarce de dimetilo o un engarce que contenga disulfuro.

La proteína S100A4 también se expresa en enfermedades asociadas a la inflamación. Por tanto, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para dirigir fármacos antiinflamatorios a los sitios de expresión.

La expresión "agente antiinflamatorio" significa cualquier fármaco antiinflamatorio que inhibe o bloquea la síntesis de prostaglandinas. Son agentes antiinflamatorios útiles, sin limitación, el ácido 5-aminosalicílico y medicamentos que lo contienen (sulfasalazina, mesalamina, mesalazina, olsalazina); ácido acetilsalicílico; corticosteroides tales como hidrocortisona, cortisona, triamcinolona, budesonida, prednisona, deflazacort, metotrexato; infliximab; adalimumab.

El anticuerpo anti-S100A4 específico del conjugado de la invención es un anticuerpo monoclonal, preferentemente un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo producido por un hibridoma ECACC 11051804 o un fragmento del mismo.

Por tanto, en otro aspecto, la divulgación se refiere a conjugados que comprenden un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la divulgación se refiere al uso de un conjugado que comprende un anticuerpo específico anti-S100A4 con actividad antiangiogénica o un fragmento de unión a S100A4 del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre una metástasis, una enfermedad asociada a una angiogénesis no deseable y una enfermedad asociada con inflamación; preferentemente una enfermedad seleccionada entre metástasis y una enfermedad donde se produce angiogénesis patógena.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un conjugado que comprende un anticuerpo anti-S100A4 específico con actividad antiangiogénica o un fragmento de unión a S100A4 del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre metástasis, una enfermedad donde se produce angiogénesis patógena y una enfermedad inflamatoria; preferentemente una enfermedad seleccionada entre metástasis y una enfermedad donde se produce angiogénesis patógena.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención en un sujeto que padece una enfermedad seleccionada entre una metástasis, una enfermedad donde se produce angiogénesis patógena y una enfermedad asociada con inflamación que comprende la administración a dicho sujeto de un conjugado que comprende un anticuerpo específico anti-S100A4 con actividad antiangiogénica o un fragmento de unión a S100A4 del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención. En una realización preferente la enfermedad se selecciona entre metástasis y una enfermedad donde se produce angiogénesis patógena.

En realizaciones preferentes, el anticuerpo anti-S100A4 específico es un anticuerpo monoclonal, preferentemente un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo producido por un hibridoma 11051804 o un fragmento del mismo.

"Medicamento", en el contexto de estos aspectos inventivos, se entiende como una composición farmacéutica que comprende un conjugado de un anticuerpo del primer aspecto de la invención o un fragmento del mismo con un compuesto útil para el tratamiento del cáncer, específicamente para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre una metástasis y una enfermedad asociada a una angiogénesis no deseada, o con un compuesto útil para el tratamiento de una enfermedad asociada con inflamación.

Los términos "prevención", "tratamiento", "metástasis", "enfermedad asociada a una angiogénesis no deseada" y "enfermedad asociada con inflamación" se han definido anteriormente en el contexto de los usos terapéuticos de la invención.

PROCEDIMIENTO DE DIAGNÓSTICO DE LA INVENCION

Puesto que la proteína S100A4 se secreta al medio extracelular por las células tumorales, su presencia puede detectarse en diversos biofluidos, siendo posible su uso para el diagnóstico del cáncer. Dicha proteína se ha encontrada también en plasma y líquido sinovial de articulaciones de pacientes que padecen enfermedades asociadas a la inflamación como la artritis reumatoide.

Por tanto, en un aspecto la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar el cáncer o una enfermedad asociada con inflamación en un sujeto que comprende:

- (a) detectar los niveles de la proteína S100A4 en un biofluido de dicho sujeto mediante el uso de un anticuerpo

monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo que consiste en ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo.

(b) comparar dichos niveles con un valor de referencia

- 5 en el que niveles aumentados de la proteína S100A4 con respecto al valor de referencia, son indicativos de que el sujeto padece cáncer o una enfermedad asociada con inflamación.

En el contexto de la presente invención, por “procedimiento *in vitro* para el diagnóstico del cáncer” se entiende un procedimiento que permite mostrar la existencia de un tumor maligno en un sujeto mediante la detección de la presencia de la proteína S100A4 soluble en un biofluido aislado de un paciente. También es útil para la documentación de la expresión de S100A4 producida por un tumor antes de la administración de fármacos dirigidos contra S100A4 para permitir la selección adecuada de pacientes y la determinación de la dosis óptima.

En el contexto de la presente invención, por “procedimiento *in vitro* para el diagnóstico de una enfermedad asociada con inflamación” se entiende un procedimiento que permite mostrar la existencia de una enfermedad inflamatoria en un sujeto mediante la detección de la presencia de la proteína S100A4 soluble en un biofluido aislado del paciente.

15 Por “sujeto” en la presente invención, se entiende cualquier animal clasificado como mamífero e incluye, pero no se limita a, a animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos y roedores. Preferentemente, el sujeto es un ser humano hombre o mujer de cualquier raza o edad. En el contexto de la presente invención, el sujeto es un sujeto que potencialmente padece cáncer o una enfermedad asociada con inflamación o un sujeto que anteriormente se ha diagnosticado con cáncer o una enfermedad asociada con inflamación.

20 La primera etapa del procedimiento de la invención comprende la determinación de los niveles de la proteína S100A4 en un biofluido del sujeto en estudio mediante el uso de los anticuerpos monoclonales de la invención.

El término “biofluido” en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier secreción biológica o fluido, ya sea fisiológica o patológica, que se produce en el cuerpo del sujeto. Dichos fluidos biológicos incluyen, sin limitación, sangre, plasma, suero, lavado broncoalveolar, orina, secreción nasal, secreción ótica, secreción uretral, líquido cefalorraquídeo, fluido pleural, fluido sinovial, fluido peritoneal, fluido ascítico, líquido pericárdico, líquido amniótico, jugo gástrico, fluido linfático, fluido intersticial, saliva, esputo, deposición líquida, lágrimas, moco, sudor, leche, semen, secreciones vaginales, fluido procedente de una úlcera, ampollas, abscesos y otras erupciones superficiales. Dichas muestras pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales, utilizando procedimientos conocidos en el estado de la técnica por un experto en la materia, tales como, extracción de sangre, instilar y aspirar líquido durante una broncofibroscopia, punción cisternal, punción lumbar o punción ventricular, punción pleural o toracocentesis, punción percutánea sinovial o articular, punción abdominal, amniocentesis, expectoraciones, punción percutánea peritoneal, punción percutánea pericárdica, etc., o mediante una recolección simple.

En una realización preferente, el biofluido se selecciona entre sangre, plasma y suero, preferentemente suero, más preferentemente plasma. La muestra de sangre se extrae normalmente mediante una punción arterial o venosa, normalmente una vena de la parte interna del codo o del reverso de la mano, siendo la muestra de sangre recolectada en un vial hermético o jeringuilla. Puede realizarse una punción capilar generalmente en el talón o en las falanges distales de los dedos para el análisis por medio de un microprocedimiento. Puede obtenerse suero a partir de una muestra de sangre completa dejando la muestra reposar durante 10 minutos en ausencia de anticoagulante para que se coagule y con posterioridad centrifugándola a 1500 rpm durante 10 minutos con el objetivo de separar las células (precipitado) del suero (sobrenadante). A su vez, para obtener la muestra de plasma de la sangre completa se pone en contacto con un anticoagulante y se centrifuga a 3.000 rpm durante 20 minutos. El precipitado de dicha centrifugación corresponde a los elementos formes y el sobrenadante corresponde al plasma.

El suero o el plasma obtenido pueden transferirse a un tubo de almacenamiento para el análisis de la muestra mediante el procedimiento de la invención.

En otra realización preferente, el biofluido es líquido sinovial de articulación. Los niveles de expresión de la proteína S100A4 pueden detectarse y cuantificarse mediante procedimientos convencionales. Dichos procedimientos incluyen, sin limitación, la detección de S100A4 midiendo su afinidad a uno de sus ligandos como RAGE y la posterior cuantificación del complejo S100A4-ligando; o mediante el uso de anticuerpos monoclonales con capacidad de unirse específicamente a la proteína S100A4 (o fragmentos de los mismos que contengan el determinante antigénico) producidos por un hibridoma seleccionado entre el grupo que consiste en ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento de unión a S100A4 que conserve la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo. Después, el complejo resultante antígeno-anticuerpo se cuantifica. En una realización preferente de la invención el anticuerpo utilizado es el anticuerpo producido por el hibridoma ECACC 10022401. Además, los anticuerpos utilizados en el procedimiento de la invención pueden, o no, estar marcados con un agente detectable. En una realización particular, el anticuerpo utilizado está conjugado con un agente detectable.

En el contexto de la presente invención, las expresiones “agente detectable” y “marcaje” son sinónimos y se refieren a un agente cuya naturaleza permite su detección mediante procedimientos enzimáticos, radioactivos o

fluorescentes. El compuesto detectable puede ser una enzima, un compuesto marcado radioactivamente o un isótopo radioactivo, un fluorocromo, un reactivo quimioluminiscente, un sustrato enzimático o un cofactor, un inhibidor enzimático, una partícula, un colorante, etc.

5 Los compuestos marcados radioactivamente mediante isótopos radioactivos, también denominados radioisótopos o radionucleidos, pueden incluir, sin limitación, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Te , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I . Los marcadores fluorescentes pueden incluir, sin limitación, rodamina, lantánidos de fósforo o FITC. Los marcadores enzimáticos pueden incluir, sin limitación, la peroxidasa de rábano picante, la β -galactosidasa, la luciferasa o la fosfatasa alcalina. El marcaje preferido incluye, pero sin limitación, la fluoresceína, una fosfatasa como la fosfatasa alcalina, la biotina, la avidina, una peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano picante y compuestos relacionados con la biotina o compuestos relacionados con la avidina (por ejemplo, estreptavidina o ImmunoPure® NeutrAvidin disponible en Pierce, Rockford, IL).

10 Existe una amplia diversidad de ensayos bien conocidos que pueden utilizarse en la presente invención, estos ensayos utilizan anticuerpos primarios no marcados y anticuerpos secundarios marcados: dichas técnicas incluyen Western-blot o transferencia Western, ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sándwich de doble anticuerpo) o técnicas basadas en el uso de micromatrices de proteínas o biochips que incluyen anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formas tales como tiras reactivas. Otras formas para detectar la proteína S100A4 incluyen técnicas tales como la cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc.

20 En una realización particular, la cuantificación de los niveles de S100A4 se realiza por medio de transferencia Western o ELISA.

25 En una realización más particular, los niveles de la proteína S100A4 o sus variantes se determinan mediante transferencia Western. La transferencia Western se basa en la detección de proteínas resueltas anteriormente por medio de un gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes e inmovilizándolas en una membrana, generalmente nitrocelulosa, mediante la incubación con un anticuerpo específico para S100A4 y un sistema de revelado (por ejemplo, quimioluminiscente).

En otra realización preferente, el diagnóstico se realiza mediante ELISA. Dicha técnica se basa en la detección de la proteína S100A4 en una muestra por medio de un anticuerpo anti-S100A4 inmovilizado sobre un sustrato y la posterior detección del complejo S100A4-anticuerpo por medio de un segundo anticuerpo.

30 El término "proteína", como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena molecular de aminoácidos unidos por enlaces covalentes o no covalentes. El término incluye, además, todas las formas fisiológicas relevantes modificadas químicamente postraduccionales. Las modificaciones postraduccionales que caen dentro del ámbito de la presente invención incluyen, por ejemplo, la escisión del péptido señal, la glicosilación, la acetilación, la fosforilación, la isoprenilación, la proteólisis, la miristoilación, el plegamiento de la proteína y el proceso proteolítico, etc. Adicionalmente, las proteínas pueden incluir aminoácidos no naturales formados por modificaciones postraduccionales o mediante la incorporación de aminoácidos no naturales durante la traducción.

El término "S100A4" se ha definido en el contexto del primer aspecto inventivo de la invención. Para el procedimiento diagnóstico de la invención, la S100A4 detectada es la que corresponde a las especies a las que pertenece el sujeto del que se ha tomado la muestra de biofluido que se ha de analizar.

40 El experto en la materia apreciará que el procedimiento de la invención puede ponerse en práctica utilizando tanto el nivel absoluto como el nivel relativo de expresión de la proteína S100A4. Por tanto, en la presente invención, la expresión "niveles de la proteína S100A4" se utiliza para referirse tanto a los niveles absolutos como a los niveles relativos de dicha proteína.

45 La expresión "niveles absolutos" se refiere a la cantidad total de proteína de interés en una muestra. Dicho valor puede proporcionarse como la concentración de la proteína expresada en unidades de masa por unidad de volumen (por ejemplo, en ng/ml de muestra), en número de moléculas de proteína por unidad de volumen (por ejemplo, en pmol proteína/ml de muestra), en unidades de masa de la proteína S100A4 por unidad de masa total de proteína (pg S100A4/mg proteína total) o en número de moléculas de S100A4 por unidad de masa de proteína total (por ejemplo en pmol S100A4/mg de proteína total).

50 La expresión "niveles relativos" se refiere a la relación entre los niveles de expresión de la proteína S100A4 objeto del estudio con una proteína de referencia, es decir, la concentración de la proteína S100A4 en forma normalizada con respecto a dicha proteína de referencia.

55 Con el fin de normalizar los valores de proteína entre las diferentes muestras, es posible comparar los niveles de proteína S100A4 en las muestras que se han de analizar con la expresión de una proteína de control. "Proteína de control" en la presente invención se entiende como una proteína cuyos niveles de expresión no cambian o solo cambian en cantidades limitadas en las células tumorales con respecto a células no tumorales. Preferentemente, la proteína de control es una proteína codificada por genes que se expresan constitutivamente, que son aquellos genes siempre activos o que se transcriben constantemente, de manera que estas proteínas se expresan constitutivamente y realizan funciones celulares esenciales. Las proteínas de control preferidas que se pueden utilizar en la presente

invención incluyen, sin limitación, β -2-microglobulina (B2M), ubiquitina, proteína ribosómica 18-S, ciclofilina, GAPDH, PSMB4, tubulina y actina.

Una vez que el nivel de expresión de S100A4 en una muestra se ha determinado, se realiza la etapa (b) de la invención que consiste en comparar los niveles de S100A4 obtenidos en la etapa (a) con un valor de referencia.

5 El “valor de referencia” deriva de un conjunto de muestras formado preferentemente por una mezcla de biofluidos que se han de analizar procedentes de individuos normales no afectador por el cáncer. Dicho valor de referencia puede determinarse mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo, la determinación de la media de los niveles de la proteína S100A4 medidos en biofluidos obtenidos de sujetos sanos. El valor de referencia se puede obtener también de las proteínas expresadas constitutivamente tomadas del mismo sujeto que se ha de analizar.

10 Una vez que se establece el valor de referencia, el valor de los niveles de S100A4 obtenidos en la etapa (a) puede compararse con este valor de referencia y, por tanto, permite detectar alteraciones en los niveles de la proteína S100A4 del sujeto con respecto al valor de referencia. Más específicamente, en el procedimiento de la invención, un aumento de los niveles de S100A4 con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece de cáncer o una enfermedad asociada con inflamación.

15 En el contexto de la presente invención, “niveles aumentados” con respecto al valor de referencia se entiende como una variación de los niveles de S100A4 por encima del valor de referencia al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más si se compara con el valor de referencia.

20 Por tanto, una vez se ha realizado la comparación, el procedimiento de la invención permite diagnosticar si un sujeto padece de cáncer o una enfermedad relacionada con la inflamación. En una realización particular, el procedimiento es adecuado para el diagnóstico del cáncer, en particular del cáncer de páncreas y de cáncer colorrectal.

En otra realización particular, el procedimiento es adecuado para el diagnóstico de una enfermedad asociada con inflamación, preferentemente la artritis reumatoide.

25 Los términos “cáncer” y “enfermedad asociada con inflamación” se han definidos previamente.

PROCEDIMIENTOS PARA DETECTAR S100A4

Los anticuerpos como se definen en el primer aspecto de la invención también pueden ser útiles para detectar S100A4 en muestras biológicas de otro tipo diferente de un biofluido. Dichos procedimientos de detección se aplican ventajosamente para el diagnóstico y/o pronóstico del cáncer o de enfermedades asociadas con inflamación que tienen células que expresan la proteína S100A4.

Estos anticuerpos pueden usarse para identificar células y tejidos que expresen la proteína S100A4 por medio de técnicas convencionales tales como la inmunofluorescencia, la citometría de flujo, cromatografía de afinidad o la inmunoprecipitación. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de la invención puede facilitar la identificación de una célula tumoral que expresa la proteína S100A4 y permitir el diagnóstico del cáncer en un sujeto.

35 Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico del cáncer o de una enfermedad asociada con inflamación en un sujeto que comprende:

- (i) detección de los niveles de la proteína S100A4 en una célula o tejido de dicho sujeto mediante un anticuerpo monoclonal específico anti-S100A4 producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo de ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo
- (ii) comparar dichos niveles con un valor de referencia

45 en el que niveles aumentados de la proteína S100A4 con respecto al valor de referencia son indicativos de que el sujeto padece cáncer o una enfermedad asociada con inflamación. La expresión “procedimiento *in vitro*” implica que dicho procedimiento se realiza con una muestra biológica aislada del sujeto del que se extrae. Dicha muestra biológica puede ser una célula, tal como, una célula sanguínea, una célula epitelial, una célula germinal, etc. o también una muestra de biopsia de un tejido.

Las expresiones “niveles de la proteína S100A4”, “variante”, “valor de referencia” y “niveles aumentados” ya se han definidos en el contexto del procedimiento de diagnóstico de la invención.

50 La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento (por ejemplo, unión física) del anticuerpo con un grupo de marcaje.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la detección de S100A4 en una muestra, que comprende:

- (i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener S100A4 con un anticuerpo específico anti-S100A4 o

un fragmento de este como se define en el primer aspecto de la invención y
 (ii) detectar la formación del inmunocomplejo entre S100A4 y el anticuerpo o un fragmento de éste

en el que la detección de inmunocomplejos entre S100A4 y el anticuerpo es indicativa de la presencia de S100A4 en la muestra.

5 En una realización preferente del procedimiento de detección de S100A4, el anticuerpo anti-S100A4 específico es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo de ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento de unión a S100A4 de dicho anticuerpo.

10 Dado que los anticuerpos monoclonales de la invención reconocen la proteína S100A4, pueden utilizarse para purificar dicha proteína de una muestra.

15 Preferentemente, para su uso en la purificación de S100A4, los anticuerpos monoclonales del primer aspecto de la invención se usan asociándolos con un soporte o sustrato. En principio, puede usarse cualquier tipo de soporte en los procedimientos de la invención, aunque el uso de soportes de tipo polimérico tales como Sephadex, se prefiere dextrano, poliaminoácidos solubles en agua, polietilenglicol (PEG), ácido poliglutámico (PGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLA/PLGA), poli(hidroxialquilmetacrilamida), un poliglicerol, una poliamidoamina (PAMAM) y una polietilenimina (PEI).

Normalmente, la purificación de S100A4 usando los anticuerpos monoclonales del primer aspecto de la invención, se realiza por medio de un procedimiento que comprende las etapas de:

- 20 (i) poner en contacto la muestra de la cual se quiere purificar la proteína S100A4, con un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo de ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, 11051803 y ECACC 11051804 o con un fragmento de unión a S100A4 del mismo inmovilizado sobre un soporte en condiciones adecuadas para que tenga lugar la unión entre el anticuerpo y la proteína S100A4;
- (ii) lavar los complejos formados en la etapa (i) para retirar todos aquellos compuestos de la muestra que se hubieran unido de forma no específica al conjugado soporte-anticuerpo y
- 25 (iii) eluir la proteína S100A4 que está unida al compuesto.

El procedimiento para la purificación de la proteína S100A4 de la invención se puede realizar utilizando cualquier procedimiento conocido de purificación de proteínas por medio de afinidad, incluyendo, por ejemplo, columnas de cromatografía de afinidad en que la fase estacionaria de que está formada por los anticuerpos monoclonales, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, conjugados a un soporte sólido.

30 KITS DE LA INVENCION Y USOS DE LOS MISMOS

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para diagnosticar el cáncer o una enfermedad asociada con inflamación en un biofluido que comprende al menos un anticuerpo anti-S100A4 específico que tiene actividad antiangiogénica o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo en el que el anticuerpo es producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo de ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, 11051803 y ECACC 11051804. En una realización particular, la enfermedad es cáncer, preferentemente cáncer de páncreas o cáncer colorrectal. En otra realización preferente, la enfermedad es una enfermedad asociada con inflamación, preferentemente artritis reumatoide.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit como se ha definido anteriormente para el diagnóstico del cáncer o una enfermedad asociada con inflamación en los biofluidos de un sujeto. En una realización particular, la enfermedad es cáncer, preferentemente cáncer de páncreas o cáncer colorrectal. En otra realización preferente, la enfermedad es una enfermedad asociada con inflamación, preferentemente artritis reumatoide.

El término "kit", como se usa en el presente documento, se refiere a una combinación de un conjunto de reactivos adecuados para la detección de los niveles de S100A4 conjuntamente con uno o más tipos de elementos o componentes (por ejemplo, otros tipos de reactivos bioquímicos, recipientes, embalaje adecuado para su venta comercial, sustratos a los que se unen los reactivos, componentes de hardware electrónico, etc).

45 En la presente invención, "reactivo adecuado para la detección de los niveles de S100A4" se entiende como un anticuerpo monoclonal específico anti-S100A4 producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo de ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento del mismo y, opcionalmente, reactivos para detectar una o más proteínas constitutivas.

50 Como podrá entenderán los expertos en la materia, los anticuerpos del kit de la invención pueden utilizarse en todas las técnicas para determinar los niveles de una proteína que se sabe que son adecuadas para el análisis de biofluidos, tales como Western-blot o transferencia Western, ELISA, RIA, EIA competitivo, DAS-ELISA, técnicas basadas en el empleo de biochips, micromatrices de proteínas, ensayos de precipitación coloidal en tiras reactivas, etc.

55 Los anticuerpos pueden fijarse a un soporte sólido tal como una membrana, un plástico o un vidrio, opcionalmente tratado para facilitar la fijación de dichos anticuerpos al soporte. Dicho soporte sólido comprende, al menos, un conjunto de anticuerpos que reconocen específicamente la proteína S100A4 y que se pueden utilizar para detectar los niveles de expresión de dicha proteína.

Los kits de la invención comprenden adicionalmente reactivos para la detección de una proteína codificada por un gen constitutivo. La disponibilidad de dichos reactivos adicionales permite la normalización de las mediciones realizadas en muestras diferentes (por ejemplo, la muestra que se ha de analizar y la muestra de control) para descartar que las diferencias en la expresión de los marcadores biológicos se deban a una cantidad diferente de la cantidad total de proteínas en la muestra más que las diferencias reales en los niveles relativos de expresión. Los genes constitutivos en la presente invención son genes que están siempre activos o que se transcriben constantemente y que codifican proteínas que se expresan constitutivamente y realizan funciones celulares esenciales. Las proteínas que se expresan constitutivamente y que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, sin limitación, β -2-microglobulina (B2M), ubiquitina, proteína ribosómica 18-S, ciclofilina, GAPDH, PSMB4, tubulina y actina.

PROCEDIMIENTOS PARA PERSONALIZAR LA TERAPIA

Los inventores han descubierto, que el tratamiento de un sujeto que padece cáncer con un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención bloquea la totalidad de la proteína S100A4 circulante que era más alta antes del tratamiento.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto diagnosticado con cáncer que comprende

- (i) la determinación de los niveles de la proteína S100A4 en un biofluido de dicho sujeto por medio del uso de un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserve la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo y
- (ii) la comparación de los niveles de la proteína S100A4 con un valor de referencia

en el que el aumento de los niveles de proteína S100A4 con respecto a un nivel de referencia es indicativo de que el paciente debe ser tratado con un anticuerpo anti-S100A4 específico que tenga actividad antiangiogénica o un fragmento del mismo que conserve sustancialmente la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo en el que el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en

- (a) un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia ELPSFLGKRT (SEQ ID NO: 3),
- (b) un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia EGFPDKQPRKK (SEQ ID NO: 24) y
- (c) un anticuerpo producido por el hibridoma ECACC 11051804.

La expresión "diseño de una terapia personalizada" significa que los resultados obtenidos por dicho procedimiento son útiles para decidir si el sujeto es un candidato para un tratamiento con los anticuerpos monoclonales de la invención.

La expresión "sujeto" se refiere a humanos y animales no humanos diagnosticados con cáncer. Como animales no humanos se incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates y primates no humanos, ovejas, perros, conejos, ratas, ratones, vacas, pollos, anfibios y reptiles.

Las expresiones "cáncer", "proteína S100A4", "variante de dicha proteína", "biofluido", "anticuerpo monoclonal", "hibridoma", "variante funcional del anticuerpo" se han definido anteriormente.

En el contexto del presente aspecto, el sujeto se selecciona para ser tratado con al menos un anticuerpo monoclonal de la invención y el mismo anticuerpo se utiliza para monitorizar los niveles de S100A4. Cuando los niveles de la proteína S100A4 son más altos que los de un nivel de referencia, el sujeto es un candidato para una terapia con la administración del anticuerpo monoclonal de la invención.

El nivel de expresión de la proteína S100A4 se puede cuantificar por medio de cualquier procedimiento convencional que permita la detección y cuantificación de dicha proteína en una muestra de un paciente. Los anticuerpos que se utilizan en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que pueden utilizarse incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos químico luminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Hay una amplia diversidad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); estas técnicas incluyen transferencia Western, ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sándwich de doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o micromatrices de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas.

En una realización preferente, la determinación de los niveles de la proteína S100A4 en la etapa (i) se realiza mediante el uso de un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo que consiste en ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento de unión a S100A4 de dicho anticuerpo.

En una realización particular, los niveles de proteína S100A4 se cuantifican por medio de transferencia Western, inmunohistoquímica o ELISA.

OTROS ASPECTOS DE LA DIVULGACIÓN

5 La presente divulgación proporciona adicionalmente el uso de un anticuerpo o fragmento del mismo o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones que se presentan en el presente documento, como un marcador para la identificación, localización, evaluación, diagnóstico, pronóstico o monitorización de un tumor o de cualquier otra enfermedad mediada por S100A4 en un sujeto.

10 La presente divulgación proporciona adicionalmente, un producto que contiene un anticuerpo o fragmento del mismo o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones que se presentan en el presente documento y un agente antineoplásico, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de tumores.

15 La presente divulgación proporciona adicionalmente un producto que contiene un anticuerpo o fragmento del mismo o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones que se presentan en el presente documento y un agente terapéutico, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de enfermedades mediadas por S100A4.

Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un polipéptido S100A4 humano o murino para su uso como un medicamento para el tratamiento de tumores.

Definiciones

20 Las expresiones "S100A4", "proteína S100A4", "proteína S100A4 de unión a calcio", "proteína de calcio", "calvasculina", "metastatina", "homólogo de la placenta murino", "MTS1", "CAPL", "p9Ka", "18A2", "pEL98", "42A", "FSP1", "proteína-1 específica de fibroblastos", "supresor 1 de transformación maligna", "proteína asociada con resistencia a multifármacos de leucemia", "OTTHUMP00000015469", OTTHUMP00000032895", se utilizan indistintamente, e incluye también variantes, isoformas, especies homólogas de S100A4 humana o murina y análogos que tengan al menos un epítipo común con S100A4 humana o murina.

25 La secuencia completa de ADNc para la S100A4 humana tiene el número de acceso Genbank M80563 (31 de octubre de 1994).

La secuencia completa de ADNc para la S100A4 murina tiene el número de acceso Genbank D00208 (5 de diciembre de 1997).

30 La secuencia de la proteína completa para la S100A4 humana tiene el número de acceso P26447 UniProt (1 de agosto, 1992):

SEQ ID NO: 21

MACPLEKALDVMVSTFHKYSGKEGDKFKLNKSELKELLTRELPSFLGKRTDEAAF
QKLMSNLDSNRDNEVDFQEYCVFLSCIAMMCNEFFEGFPDKQPRKK

La secuencia completa para la proteína S100A4 murina tiene el número de acceso P07091 UniProt (1 de abril, 1988).

35 El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca los anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales completos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos lo suficientemente largos siempre que presenten la actividad biológica deseada.

40 Un "anticuerpo" intacto, incluye glicoproteínas heteromultiméricas que comprendan al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Normalmente, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace covalente disulfuro, mientras que el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina varía. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro intracatenarios. Cada cadena pesada tiene en un extremo una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o VH) seguido de una región constante de cadena pesada. La
45 región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera tiene una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera en su otro extremo. La región constante de cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el
50 extremo amino-terminal al extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes no están directamente involucradas en la unión del anticuerpo al antígeno, pero

presentan diversas funciones efectoras, como la participación en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), la fagocitosis a través de la unión al receptor Fcγ, la tasa de semivida/eliminación vía neonatal receptor Fc (FcRn) y la citotoxicidad dependiente de complemento a través del componente C1q de la cascada del complemento.

- 5 El término "fragmento" cuando se refiere a un anticuerpo, significa fragmentos de un anticuerpo con capacidad de unión al antígeno que comprenden una secuencia parcial de cadena pesada o ligera variable, que conservan la capacidad de unirse a S100A4 humana o murina. Ejemplos de fragmentos incluyen, sin limitarse a, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprenda dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de una sola cadena de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) *Nature* 341: 544-546.), que consiste en un dominio VH y (vi) una región aislada determinante de complementariedad (CDR). Los fragmentos se pueden preparar mediante técnicas recombinantes o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos, por ejemplo, digestión con papaína (véase, por ejemplo, el documento WO94/29348).
- 10
- 15 Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, por un engarce sintético que permite que se haga una cadena proteica simple en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv)); Véase, por ejemplo, Bird y col. *Science*. (1988); 242: 423-426 y Huston y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988); 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos monocatenario se incluyen por referencia en el término "anticuerpo".
- 20

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad única de unión y afinidad para un epítipo particular o sitio de unión antigénico. Los anticuerpos monoclonales son producidos por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de células B descendiente de una sola y única célula original y una célula tumoral plasmática. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante único en el antígeno.

25

- 30 La expresión "anticuerpo diclonal" se refiere a una preparación de al menos dos anticuerpos contra S100A4 murina o humana. Normalmente, los diferentes anticuerpos se unen a diferentes epítopos.

La expresión "anticuerpo oligoclonal" se refiere a una preparación de 3 a 100 anticuerpos diferentes contra S100A4 murina o humana. Normalmente, los anticuerpos en una preparación de este tipo se unen a una gama de epítopos diferentes.

- 35 La expresión "anticuerpo policlonal" se refiere a una preparación de más de 1 (dos o más) anticuerpos diferentes contra S100A4 murina o humana procedente de diferentes estirpes celulares B, es decir, anticuerpos que son una mezcla de inmunoglobulinas, secretadas contra un antígeno específico (S100A4). Una preparación de este tipo incluye anticuerpos que se unen a una gama de epítopos diferentes.

La expresión "anticuerpo biespecífico" se refiere a aquel anticuerpo que tiene dos especificidades de unión diferentes, véanse, por ejemplo, las Patentes US 5.922.845 y US 5.837.243; Zeilder (1999) *J. Immunol.* 163: 1246-1252; Somasundaram (1999) *Hum. Antibodies* 9: 47-54; Keler (1997) *Cancer Res.* 57: 4008-4014. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico puede tener un sitio de unión para un antígeno de superficie de la célula y un segundo sitio de unión para un receptor Fc en la superficie de una célula efectora. Los anticuerpos biespecíficos modelo pueden unirse a dos epítopos diferentes del marcador de superficie de las células B. Otros de dichos anticuerpos pueden unirse a un primer marcador de célula B y adicionalmente unirse a un segundo marcador de superficie de célula B. Como alternativa, un brazo de unión para un marcador celular anti-B se puede combinar con un brazo que se une a una molécula disparadora en leucocitos, tal como una molécula de receptor de linfocito T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD 16), de manera que los mecanismos de defensa celular se concentran en la célula B. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos contra célula B. Estos anticuerpos tienen un brazo de unión al marcador linfocitario y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide de la vinca, cadena A de la ricina, metotrexato o haptenos marcados con isótopos radioactivos). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos completos o como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab)₂).

40

45

50

- 55 Los anticuerpos biespecíficos incluyen adicionalmente diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero usando un engarce que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P. y col. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1993); 90: 6444-6448; Poljak, RJ

col. *Structure*. (1994); 2: 1121-1123). La expresión "anticuerpo multiespecífico" se refiere a aquel anticuerpo que tiene al menos tres sitios de unión o especificidades.

- El término "epítipo" se refiere a un determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo, o el lugar en el que un anticuerpo se une a su Ag, o por extensión al péptido presentado en una molécula de MHC a la que un receptor de linfocito T se une. Los epítipos consisten en agrupaciones de moléculas con superficies químicamente activas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y por lo general tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características específicas de cargas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.
- 10 El término "aislado" significa identificado y separado de su entorno natural. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente naturalmente en un organismo vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado", incluyendo, pero no limitado a cuando dicho polinucleótido o polipéptido se introduce de nuevo en una célula, incluso si la célula es de la misma especie o tipo que aquella de la que el polinucleótido o polipéptido se separó.
- 15 La frase "un agente eficaz para inducir una respuesta inmunitaria frente a un antígeno" se refiere a una sustancia diferente del anticuerpo monoclonal de la presente invención que actúa como un estimulador de la respuesta inmunitaria aumentando así la respuesta a la vacuna, sin tener ningún efecto antigénico específico en sí mismo. Este agente también se conoce en la técnica como un adyuvante. Los ejemplos incluyen el lípido A, proteínas derivadas de *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*, adyuvante Incompleto de Freund y adyuvante Completo (Difeo Laboratories, Detroit, MI); Merck Adyuvante 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, sales de calcio, hierro o zinc; suspensión insoluble de tirosina acilada azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónica o amónicamente; microesferas polifosfocenos biodegradables; monofosforil lípido A y Quil A. Las citocinas, tales como GM-CSF o interleuquina-2, -7, o -12, también se pueden usar como adyuvantes.
- 20 La frase "se une específicamente" cuando se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno del mismo significa que el anticuerpo se une a S100A4 murina o humana sin unión o con unión insignificante a otras proteínas murinas o humanas. El término sin embargo no excluye el hecho de que los anticuerpos de la invención puedan también presentar reactividad cruzada con otras formas de S100A4. La frase "se une específicamente" se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Normalmente, el anticuerpo se une con una constante de asociación (K_a) de al menos aproximadamente $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ o 10^7 M^{-1} , o aproximadamente 10^8 M^{-1} a 10^9 M^{-1} , o aproximadamente 10^{10} M^{-1} a 10^{11} M^{-1} o mayor y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan en el presente documento de forma intercambiable con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".
- 25 La frase "se une (o unen) específicamente" o "específicamente se une (o unen)" cuando se refiere a un péptido se refiere a una molécula peptídica que tiene afinidad de unión intermedia o alta, exclusiva o predominantemente, para la molécula diana. La frase "se une específicamente a" se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de una proteína diana en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Por tanto, bajo condiciones de ensayo designadas, las zonas de unión especificadas se unen preferentemente a una proteína diana particular y no se unen en una cantidad significativa a otros componentes presentes en una muestra de ensayo. La unión específica a una proteína diana en dichas condiciones puede requerir una zona de unión que se selecciona por su especificidad para un antígeno diana particular. Una diversidad de formatos de ensayo se puede usar para seleccionar ligandos que sean específicamente reactivos con una proteína particular. Por ejemplo, inmunoensayos ELISA en fase sólida, inmunoprecipitación, Biacore y transferencia Western se usan para identificar péptidos que reaccionan específicamente con S100A4 humana o murina. Normalmente una reacción específica o selectiva tendrá al menos dos veces la señal de fondo o ruido y más normalmente más de 10 veces la señal de fondo.
- 30 El término "bloqueo" como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva en relación con anticuerpos y fragmentos del mismo de unión a antígeno de la presente invención, significa que la actividad biológica de S100A4 humana o murina se reduce en presencia de los anticuerpos y fragmentos del mismo de unión a antígeno de la presente invención en comparación con la actividad de S100A4 humana o murina en ausencia de tales anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. El bloqueo puede deberse a, pero no limitado a una o más uniones a ligando neutralizantes, evitando la activación del receptor por el ligando, por regulación decreciente de la S100A4 humana o murina, o afectando su funcionalidad efectora. Los niveles de bloqueo se pueden medir de varias maneras, por ejemplo, mediante el uso de los ensayos tales como los que se establecen en los ejemplos siguientes, de actividad proteolítica, migración celular, desarrollo tumoral, angiogénesis tumoral y la diseminación del tumor (metástasis).
- 35 Si un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es capaz de bloquear entonces esto es indicativo de la

inhibición de la interacción entre la unión de la proteína S100A4 murina o humana a su receptor.

La frase "un mecanismo de acción de una proteína S100A4 humana o murina" se refiere a cada una de las funciones intracelulares y extracelulares de la proteína S100A4. Las funciones intracelulares de la proteína S100A4 incluyen aquellas de interferir con funciones celulares vitales tales como la motilidad celular, invasión, división celular y supervivencia (Kriajevska MV y col. *J Biol Chem.* 1994; 269 (31): 19679-82 y Grigorian M y col. *J Biol Chem.* 2001; 276 (25): 22699-708); unión a varias proteínas diana intracelulares y su función moduladora, tal como la cadena pesada de la miosina no muscular II (Kriajevska MV y col., *J. Biol. Chem.* 1994; 269 (31): 19679-82 y Ford HL y col. *Oncogene* 1995; 10 (8): 1597-1605); y Liprin β 1 (Kriajevska M y col. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (7): 5229-35); interactuando con la proteína p53 supresora de tumores y regulando su función transactivacional, de este modo modulando diferencialmente la expresión de genes p53-diana de manera célula-específica (Grigorian M y col. *J Biol Chem* 2001; 276 (25): 22699-708). Las funciones extracelulares de la proteína S100A4 incluyen aquellas de modulación específica de célula de la motilidad celular tumoral, supervivencia y apoptosis; actuando como un factor angiogénico (Ambartsumian N y col. *Oncogene.* 2001; 20 (34): 4685-95; Pedersen MV y col. *J Neurosci Res.* 2004; 77 (6): 777-86; Belot N y col. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1600 (1-2): 74-83 y Pedersen KB y col. *BMC Cancer.* 2004; 19; 452); promotor de metástasis; potenciando la red de vasos sanguíneos de los tumores; estimulando la neovascularización, aumentando la motilidad de las células endoteliales; remodelando el citoesqueleto de las células tumorales; promocionando la motilidad y la adhesión celular, facilitando la degradación de la matriz extracelular a través de la inducción de MMP proteolíticamente activas. Las funciones extracelulares de la S100A4 también incluyen las de direccionamiento a las células endoteliales del tumor, mediante la unión al receptor RAGE y desencadenando una cascada de eventos ya sea a través de la transducción de señales o por internalización seguida por la interacción con las proteínas diana intracelulares (p53, miosina no muscular y otras). Como resultado, las células tumorales adquieren una actividad fenotípica metastásica más avanzada. Funciones adicionales extracelulares de la S100A4 incluyen la acción sobre células endoteliales estimulando su motilidad, aumentando la angiogénesis tumoral y, por tanto, proporcionando rutas para la diseminación metastásica (Schmidt-Hansen B y col. *J Biol Chem.* 2004; 279 (23): 24498-504).

La expresión "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a una constante de asociación en equilibrio (K_a) de al menos aproximadamente $10^7 M^{-1}$, al menos aproximadamente $10^8 M^{-1}$, al menos aproximadamente $10^9 M^{-1}$, al menos aproximadamente $10^{10} M^{-1}$, al menos aproximadamente $10^{11} M^{-1}$, o al menos aproximadamente $10^{12} M^{-1}$, o mayor, por ejemplo, hasta $10^{13} M^{-1}$ o $10^{14} M^{-1}$ o mayor. Sin embargo, la "alta afinidad" de unión puede variar para otros isotipos de anticuerpos.

El término " K_a ", como se usa en la presente memoria, pretende referirse a la constante de equilibrio de asociación de una determinada interacción anticuerpo-antígeno. Esta constante tiene unidades de 1/M.

El término " K_d ", como se usa en la presente memoria, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una determinada interacción anticuerpo-antígeno. Esta constante tiene unidades de M.

El término " k_a ", como se usa en la presente memoria, pretende referirse a la constante cinética de asociación de una determinada interacción anticuerpo-antígeno. Esta constante tiene unidades de 1/Ms.

El término " k_d ", como se usa en la presente memoria, pretende referirse a la constante de disociación cinética de una determinada interacción anticuerpo-antígeno. Esta constante tiene unidades de 1/s.

La frase "interacciones particulares anticuerpo-antígeno" se refiere a las condiciones experimentales en las que se miden las constantes de equilibrio y cinéticas.

La frase "interacciones particulares anticuerpo-antígeno" se refiere a las condiciones experimentales en las que se miden las constantes de equilibrio y cinéticas.

El término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" pretende que incluya moléculas de ADN y moléculas de ARN. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario.

La expresión "ácido nucleico aislado" o "polinucleótido aislado" en referencia a los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de los mismos (por ejemplo, VR, VL, CDR3) que se unen a S100A4 humana o murina, pretende hacer referencia a un ácido nucleico en que las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo o porción de anticuerpo están libres de otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpo que se unen a antígenos distintos de S100A4 humana o murina, que podrían flanquear naturalmente el ácido nucleico en el ADN genómico humano.

El término "estabilidad" como se utiliza en relación con los anticuerpos y fragmentos de los mismos se refiere a la actividad del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno determinado mediante ELISA directo de unión que es comparable 12 días después de la incubación en suero a los valores de CE_{50} de partida a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, o $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La expresión "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) derivadas de secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana. Los anticuerpos de secuencia humana de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias humanas de estirpe germinal de la inmunoglobulina (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o mutagénesis *in vitro* específica de sitio o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la estirpe germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias de región marco conservada humanas (es decir, anticuerpos humanizados).

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un tipo de anticuerpo manipulado genéticamente que contiene un dominio variable de origen natural (cadena ligera y cadena pesada) derivado de un anticuerpo donante en asociación con las regiones de cadena ligera y pesada constante derivados de un anticuerpo aceptor.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo manipulado genéticamente que tiene CDR derivados de una inmunoglobulina donante no humana, siendo las restantes partes de la molécula de inmunoglobulina derivadas de una (o más) inmunoglobulinas humanas. Además, los restos de soporte de la región marco conservada se pueden alterar para conservar la afinidad de unión (véase, por ejemplo, Queen y col. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1989); 86: 10029-10032, Hodgson y col, *Bio/Technology*, 9: 421 (1991)). Un anticuerpo aceptor humano adecuado puede ser uno seleccionado entre una base de datos convencional, por ejemplo, la base de datos RABAT®, base de datos Los Álamos y base de datos Swiss-Prot, por homología con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del anticuerpo donante. Un anticuerpo humano caracterizado por la homología con las regiones marco conservadas del anticuerpo donante (sobre la base de aminoácidos) puede ser adecuado para proporcionar unas regiones marco conservadas para la región constante de cadena pesada y/o la región variable de cadena pesada para la inserción de las CDR donantes. Un anticuerpo aceptor adecuado capaz de donar regiones marco conservadas de cadena ligera constante o variable se puede seleccionar de una manera similar. Cabe señalar que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo aceptor no es necesario que se originen a partir del mismo anticuerpo aceptor. El estado de la técnica anterior describe varias maneras de producir dichos anticuerpos humanizados - véase por ejemplo el documento EP-A-0239400 y el documento EP-A-054951.

La expresión "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) que aporta las secuencias de aminoácidos de sus dominios variables, CDR u otros fragmentos funcionales o análogos de las mismas a un primer compañero de inmunoglobulina, así como para proporcionar las regiones codificantes alteradas de la inmunoglobulina con el resultado de la expresión de un anticuerpo alterado con la actividad antigénica específica y neutralizante característica del anticuerpo donante.

La expresión "anticuerpo aceptor" se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) heterólogo al anticuerpo donante, que contribuye con todas (o cualquier porción, pero preferentemente todas) las secuencias de aminoácidos que codifican las regiones marco conservadas de sus regiones marco conservadas de cadena pesada y/o ligera y/o las regiones constantes de la cadena pesada y/o de la cadena ligera al primer compañero de inmunoglobina. El anticuerpo humano es el anticuerpo aceptor.

El acrónimo "CDR" se refiere a la región con las secuencias de aminoácidos determinantes de la complementariedad de un anticuerpo que son los dominios hipervariables de las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera. Véase, por ejemplo, Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4^a ed., EE.UU. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Hay tres CDR de cadenas pesadas y tres de cadena ligera (o regiones CDR) en la región variable de una inmunoglobulina. Por tanto, "CDR" como se usan en el presente documento se refieren a las tres CDR de cadena pesada, o a las tres CDR de cadena ligera (o ambas, todas las CDR de cadena pesada y todas las CDR de cadena ligera, si es apropiado). La estructura y el plegamiento de la proteína del anticuerpo puede significar que otros restos se consideren parte de la región de unión al antígeno y que así seía entendido por un experto. Véase, por ejemplo, Chothia y col., (1989) *Conformations of immunoglobulin hypervariable domains*; *Nature* 342, páginas 877-883. Las CDR proporcionan la mayoría de restos de contacto para la unión del anticuerpo al antígeno o epítipo. Las CDR de interés en la presente invención derivan de secuencias de las regiones variables de las cadenas variables pesadas y ligeras del anticuerpo donante, e incluyen análogos de las CDR de origen natural, que también comparten o conservan la misma especificidad de unión al antígeno y/o la capacidad de neutralización como la del anticuerpo donante del que se derivaron.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, los restos de aminoácidos en secuencias de anticuerpos se numeran de acuerdo con el esquema de Kabat. De manera similar, los términos "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" siguen el sistema de numeración de Kabat como se establece en Kabat y col.; *Sequences of proteins of Immunological Interest* NIH, 1987. Será evidente para los expertos en la materia que hay definiciones alternativas de secuencias de CDR, como por ejemplo las que figuran en Chothia y col. (1989).

Será evidente para los expertos en la materia que el término "derivado" pretende definir no solamente la fuente en el sentido de que sea el origen físico del material, sino también definir un material que es estructuralmente idéntico (en términos de secuencia primaria de aminoácidos) al material pero que no se origina a partir de la fuente de referencia. Por tanto, por ejemplo, "restos encontrados en el anticuerpo donante a partir del que deriva CDRH3" no necesariamente se han purificado a partir del anticuerpo donante.

Los términos "VH" y "VL" se refieren al dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo, respectivamente.

La expresión "función efectora" como se usa en el presente documento, pretende referirse a una o más actividades citotóxicas mediadas por células y dependientes de anticuerpo (ADCC) y de las respuestas citotóxicas dependientes de complemento (CDC), fagocitosis mediadas por Fc y reciclado de anticuerpo vía receptor FcRn. La interacción entre la región constante de un anticuerpo y diversos receptores de Fc (FcR) se cree que media las funciones efectoras del anticuerpo. Importantes efectos biológicos pueden ser una consecuencia de la funcionalidad efectora, en particular, citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpo (ADCC), fijación del complemento (citotoxicidad dependiente de complemento o CDC), fagocitosis (fagocitosis mediada por células y dependiente de anticuerpo o ADCP) y semivida/aclaramiento del anticuerpo. Por lo general, la capacidad para mediar la función efectora requiere la unión del anticuerpo a un antígeno y no todos los anticuerpos mediarán cada función efectora. La función efectora puede medirse de varias maneras, incluyendo por ejemplo a través de la unión de la FcγRIII a linfocitos NK (citotóxicos naturales) o a través de FcγRI a monocitos/macrófagos para medir la función efectora ADCC.

Se pueden realizar diversas modificaciones de la región constante de cadena pesada de anticuerpos en función de la propiedad efectora deseada. Las regiones constantes humanas que carecen esencialmente de las funciones de a) activación del complemento por la vía clásica y b) mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo incluyen la región constante de IgG4 y la región constante de IgG2. Se han descrito por separado regiones constantes de IgG1 que contienen mutaciones específicas que reducen la unión a los receptores Fc y, por tanto, reducen la ADCC y CDC (Duncan y col. *Nature*. 1988; 332: 563-564; Lund y col. *J. Immunol.* 1991; 147: 2657-2662; Chappel y col. *PNAS*. 1991; 88: 9036-9040; Burton y Woof. *Adv Immunol.* 1992; 51: 1-84; Morgan y col. *Immunology*. 1995; 86: 319-324; Hezareh y col. *J. Virol.* 2001; 75 (24): 12161-12168). También se han descrito regiones constantes de IgG1 humana conteniendo mutaciones específicas o glicosilaciones alteradas en el resto Asn297 que aumentan la unión a los receptores Fc. Estos también se ha visto que aumentan la ADCC y CDC, en algunos casos (Lazar y col. *PNAS*. 2006; 103: 4005-4010; Shields y col. *J Biol Chem.* 2001; 276: 6591-6604; Nechansky y col. *Mol Immunol.* 2007; 44: 1815-1817).

Para los anticuerpos IgG, las funcionalidades efectoras incluyendo ADCC y ADCP están mediadas por la interacción de la región constante de cadena pesada con una familia de receptores Fcγ presentes en la superficie de las células inmunitarias. En los seres humanos estos incluyen FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). La interacción entre el anticuerpo unido al antígeno y la formación del complejo Fc/Fcγ induce una gama de efectos que incluyen la citotoxicidad, la activación de las células inmunitarias, la fagocitosis y la liberación de citocinas inflamatorias. Sustituciones específicas en la región constante (incluyendo S239D/I332E) son conocidas por aumentar la afinidad de la región constante de cadena pesada para determinados receptores de Fc, aumentando de este modo la funcionalidad efectora del anticuerpo (Lazar y col. *PNAS*. 2006).

El término "homología" o "homología de secuencia" se refiere al grado de similitud entre las secuencias, que se debe a su ascendencia compartida. Existen varias bases de datos de secuencias con herramientas para la búsqueda de similitudes conocidas por los expertos en la materia, tales como FASTA, BLAST, para calcular homologías.

El término "identidad" o "identidad de secuencia" significa, para polinucleótidos y polipéptidos, como en el caso puede ser, la comparación calculada mediante el uso de un algoritmo proporcionado en (1) y (2) a continuación:

(1) La identidad para los polinucleótidos se calcula multiplicando el número total de nucleótidos en una secuencia dada por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese resultado del número total de nucleótidos de dicha secuencia, o:

$$nn \leq xn - (xn \cdot y),$$

en el que nn es el número de alteraciones de nucleótidos, xn es el número total de nucleótidos en una secuencia dada y es 0,95 para 95 %, 0,97 para 97 % o 1,00 para 100 % y \cdot es el símbolo para el operador de multiplicación y en la que cualquier producto no entero de xn e y se redondea hacia abajo al entero más cercano antes de restarlo de xn. Las alteraciones de una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido pueden crear mutaciones sin sentido, de sentido erróneo o de marco de lectura en esta secuencia codificante y, por tanto, alterar el polipéptido codificado por el polinucleótido siguiendo dichas alteraciones.

(2) La identidad de los polipéptidos se calcula multiplicando el número total de aminoácidos por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese producto de dicho número total de aminoácidos, o:

$$na \leq xa - (xa \cdot y),$$

en el que na es el número de alteraciones de aminoácidos, xa es el número total de aminoácidos en la secuencia y es 0,95 para 95 %, 0,97 para 97 % o 1,00 para 100 % y \cdot es el símbolo del operador de multiplicación y en la que cualquier producto no entero de xa e y se redondea hacia abajo al entero más cercano antes de restarlo de xa.

El término "variante" o "variantes" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia respectivamente, pero conserva propiedades esenciales. Una variante típica de un polinucleótido difiere en la secuencia de nucleótidos de otro, polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante mayor pueden no alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios de nucleótidos pueden implicar sustituciones, adiciones, deleciones de aminoácidos, proteínas de fusión y truncamientos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se comenta a continuación. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos de otro, polipéptido de referencia. Generalmente, las diferencias se limitan de manera que las secuencias del polipéptido de referencia y de la variante son muy similares en conjunto y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, deleciones en cualquier combinación. Un resto de aminoácidos mayor sustituido o insertado puede no ser uno de los codificados por el código genético. Está bien reconocido en la técnica que determinadas sustituciones de aminoácidos son consideradas como "conservadoras". Los aminoácidos se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral y las sustituciones dentro de los grupos que mantienen toda o sustancialmente toda la afinidad de unión del anticuerpo de la invención o su fragmento de unión al antígeno y se consideran sustituciones conservadoras, véase la tabla siguiente:

| Cadena lateral | Miembros |
|--|-------------------------|
| hidrófoba | Met, Ala, Val, Leu, Ile |
| hidrófila neutra | Cys, Ser, Thr |
| ácida | Asp, Glu |
| básica | Asn, Gin, His, Lys, Arg |
| restos que influyen en la orientación de la cadena | Gly, Pro |
| aromática | Trp, Tyr, Phe |

Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede ser una variante de origen natural tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se sabe que se produce naturalmente. Variantes de polinucleótidos y polipéptidos de origen no natural pueden hacerse mediante técnicas de mutagénesis, mediante síntesis directa y mediante otros procedimientos recombinantes conocidos por los expertos.

Producción de anticuerpos quiméricos y humanizados

El uso de anticuerpos intactos no humanos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos lleva consigo la posibilidad de problemas bien establecidos de inmunogenicidad, es decir, el sistema inmunitario del paciente puede reconocer el anticuerpo intacto no humano como no propio y efectuar una respuesta neutralizante. Esto es particularmente evidente tras la administración múltiple de anticuerpos no humanos a un paciente humano. Se han desarrollado diversas técnicas a lo largo de los años para solucionar estos problemas y generalmente implican la reducción de la composición de secuencias no humanas de aminoácidos en el anticuerpo intacto, mientras que conserven con relativa facilidad la obtención de anticuerpos no humanos a partir de un animal inmunizado por ejemplo, ratón, rata o conejo. En términos generales dos enfoques se han utilizado para conseguir esto. Los primeros son anticuerpos quiméricos, que generalmente comprenden un dominio variable no humano (por ejemplo, roedor, tal como ratón) fusionado con una región constante humana. Debido a que el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo se localiza dentro de los dominios variables, el anticuerpo quimérico mantiene su afinidad de unión por el antígeno, pero adquiere las funciones efectoras de la región constante humana y es, por tanto, capaz de realizar funciones efectoras tales como las descritas anteriormente. Los anticuerpos quiméricos se producen normalmente usando procedimientos de ADN recombinante. El ADN que codifica los anticuerpos (por ejemplo, ADNc) se aísla y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas H y L del anticuerpo de la invención). Las células de hibridoma sirven como fuente habitual de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se coloca en vectores de expresión que después se transfieren en células huésped tales como *E. coli*, células COS, células CHO o células de mieloma que por otra parte no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis del anticuerpo. El ADN puede modificarse mediante la sustitución de secuencias codificantes de las cadenas L y H humanas para las correspondientes regiones constantes H y L no humanas (por ejemplo, murinas), véase, por ejemplo, Morrison; PNAS 81, 6851 (1984).

El segundo enfoque implica la generación de anticuerpos humanizados en los que el contenido no humano del anticuerpo se reduce mediante la humanización de los dominios variables. Dos técnicas de humanización han ganado popularidad. La primera es la humanización por injerto de CDR. Las CDR forman bucles cerca del extremo N-terminal del anticuerpo donde forman una superficie encima de la región marco conservada proporcionado por las regiones marco conservadas. La especificidad de unión al antígeno del anticuerpo se define principalmente por la topografía y por las características químicas de sus CDR de superficie. Estas características están a su vez determinadas por la conformación de las CDR individuales, por la disposición relativa de las CDR y por la naturaleza y disposición de las cadenas laterales de los restos que comprenden las CDR. Una gran disminución de la inmunogenicidad se puede lograr injertando, solo las CDR de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) (anticuerpos "donantes") en las regiones marco conservadas, humanas ("región marco conservada aceptora") y regiones constantes, (véase Jones y col. (1986) *Nature* 321.522-25 y Verhoeyen M y col. (1988) *Science* 239, 1534-

1536). Sin embargo, los injertos de CDR per se, pueden no producir la retención completa de las propiedades de unión al antígeno y se encuentra con frecuencia que es necesario conservar algunos restos de las regiones marco conservadas (a veces denominados como "mutaciones retrógradas") del anticuerpo donante en la molécula humanizada si se necesita recuperar una significativa afinidad de unión al antígeno (véase Queen C y col. (1989) *PNAS* 86, 10029-10033; Co M y col. (1991) *Nature* 351, 501-502). En este caso, los dominios variables humanos que muestran la mayor homología de secuencia con el anticuerpo donante no humano se eligen a partir de una base de datos con el fin de proporcionar la región marco conservada humana (FR). La selección de FR humanos se puede hacer tanto a partir del consenso humano o de anticuerpos humanos individuales. Cuando es necesario, los restos clave del anticuerpo donante se sustituyen en la región marco conservada del aceptor humano para conservar las conformaciones de las CDR. Los modelos computarizados del anticuerpo se pueden utilizar para ayudar a identificar estos restos estructuralmente importantes, véase el documento WO99/48523.

Como alternativa, la humanización puede conseguirse mediante un procedimiento de "recubrimiento". Un análisis estadístico de los dominios variables de cadena pesada y ligera de una inmunoglobulina única humana y murina reveló que los patrones precisos de los restos expuestos son diferentes en los anticuerpos humanos y murinos y la mayoría de las posiciones superficiales individuales tienen una fuerte preferencia por un pequeño número de diferentes restos (véase Padlan EA y col. *Mol. Immunol.* (1991); 28: 489-498 y Pedersen JT y col. *J. Mol. Biol.* (1994); 235: 959-973).

Por tanto, es posible reducir la inmunogenicidad de un Fv no humano reemplazando restos expuestos en sus regiones marco conservadas que difieren de los que habitualmente se encuentran en los anticuerpos humanos. Debido a que la antigenicidad de proteínas puede correlacionarse con la accesibilidad de superficie, el reemplazo de los restos en la superficie puede ser suficiente para hacer "invisible" el dominio variable de ratón al sistema inmunitario humano (véase también Mark GE y col. *Handbook of Experimental Pharmacology.* (1994); vol. 113: *The pharmacology of monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, páginas 105-134). Este procedimiento de humanización se denomina como "recubrimiento", ya que solamente la superficie del anticuerpo se altera, los restos de soporte permanecen inalterados.

Producción de anticuerpos humanos

Los anticuerpos monoclonales (mAb) de la invención pueden producirse mediante una diversidad de técnicas, incluyendo la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica convencional de hibridación de célula somática de Kohler y Milstein, *Nature.* (1975); 256: 495. Cualquier técnica para la producción de anticuerpos monoclonales se puede emplear, por ejemplo, transformación vírica u oncogénica de linfocitos B. Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Protocolos de inmunización y técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la técnica. Los compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988), *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Nueva York).

Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra S100A4 murina o humana pueden generarse usando ratones transgénicos que lleven un sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Hay disponibles varias cepas de ratones transgénicos en los que sus locus de inmunoglobulina de ratón se han reemplazado con segmentos de genes de inmunoglobulina humana (véase Tomizuka K. *PNAS.* (2000); 97: 722-727; Fishwild DM. *Nature Biotechnol.* (1996); 14: 845-851, Mendez MJ. *Nature Genetics.* (1997); 15: 146-156). Después de la exposición al antígeno, dichos ratones son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos a partir de que se pueden seleccionar los anticuerpos de interés. De particular interés es el sistema Trímera™ (véase Eren R y col. *Immunology.* (1998); 93: 154-161) donde se trasplantan linfocitos humanos en ratones irradiados, el Sistema de Selección de Anticuerpos de Linfocitos (SLAM, véase Babcook y col. *PNAS.* (1996); 93: 7843-7848) donde linfocitos humanos (o de otras especies) se someten eficazmente a un procedimiento *in vitro* de generación conjunta masiva de anticuerpos seguido de deconvolución por dilución límite y procedimientos de selección y el XenoMouse II™ (Abgenix Inc). Un procedimiento alternativo está disponible en Morphotek Inc utilizando la tecnología Morphodoma™.

En los siguientes ejemplos se describen procedimientos detallados para la generación de anticuerpos monoclonales completamente humanos de la S100A4 humana o de ratón. La experiencia acumulada con varios antígenos ha mostrado que hay una respuesta cuando ratones transgénicos se inmunizan por vía intraperitoneal (IP) desde un inicio con el antígeno en adyuvante de Freund completo, seguido de inmunizaciones IP cada quince días (hasta un total de 6) con el antígeno en adyuvante de Freund incompleto. Sin embargo, otros adyuvantes distintos al de Freund también han mostrado eficacia. Además, las células enteras han demostrado ser altamente inmunogénicas sin adyuvante. La respuesta inmunitaria puede seguirse durante el protocolo de inmunización en muestras de plasma obtenidas por sangrados retroorbitales. El plasma se puede analizar mediante ELISA y pueden emplearse los ratones con un título suficiente de inmunoglobulina humana anti-S100A4 para las fusiones. La respuesta de los ratones puede reforzarse por inyección del antígeno por vía intravenosa 3 días antes del sacrificio y extirpación del bazo. Se espera que haya que realizar 2-3 fusiones por inmunización. Para cada antígeno se inmunizan generalmente de 6 a 24 ratones.

Para purificar los anticuerpos humanos anti-S100A4, los hibridomas seleccionados se pueden cultivar en matraces de agitación de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). Se puede controlar la IgG eluida por electroforesis en gel y por cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar la pureza. La solución tampón se puede intercambiar por PBS y la concentración se puede determinar mediante DO a 280 nm usando 1,43 como coeficiente de extinción. Se pueden hacer alícuotas de los anticuerpos monoclonales y pueden almacenarse a -80 °C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales humanos anti-S100A4 seleccionados se unen a epítomos únicos, cada anticuerpo puede biotinizarse utilizando reactivos disponibles en el mercado (Pierce, Rockford, IL). Los estudios de competición utilizando anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados se pueden realizar utilizando placas ELISA con los pocillos recubiertos de S100A4 humana o murina. La unión del mAb biotinilado puede detectarse con una sonda de fosfatasa alcalina-estreptavidina.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, se puede realizar un ELISA de isotipos. Los pocillos de placas de microtitulación se pueden recubrir con pg/ml de IgG anti-humana durante toda la noche a 4 °C. Después del bloqueo con 1 % de BSA, las placas se hacen reaccionar con 1 pg/ml o menos de anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados a temperatura ambiente durante una a dos horas. El contenido de los pocillos se puede hacer reaccionar con cualquiera de las IgG1 o IgM humanas mediante sondas específicas de conjugado con fosfatasa alcalina. Las placas se revelaron y se analizan como se ha descrito anteriormente.

Para demostrar la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan la S100A4 humana o murina, se puede emplear la citometría de flujo. Brevemente, las estirpes celulares que expresan S100A4 humana o murina (cultivadas en condiciones de crecimiento convencionales) se mezclan con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene BSA al 0,1 % y suero bovino fetal al 10 % y se incuban a 37 °C durante 1 hora. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con anti-IgG humana marcada con fluoresceína en las mismas condiciones que la tinción con el anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse mediante un instrumento FACScan usando propiedades de la luz y de la dispersión lateral para definir la vista de células individuales. Puede usarse un ensayo alternativo que usa microscopía de fluorescencia además de, o en vez de la citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se ha descrito anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia. Este procedimiento permite la visualización de células individuales, pero puede haber una disminución de la sensibilidad dependiendo de la densidad del antígeno.

Las IgG anti-S100A4 humanas pueden someterse a ensayo adicionalmente para determinar la reactividad frente al antígeno de la S100A4 humana o murina mediante transferencia Western. Brevemente, los extractos celulares de células que expresan S100A4 humana o murina se pueden preparar y someter a electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero bovino fetal al 10 % y se detectan con los anticuerpos monoclonales que se han de someter a ensayo. La unión a la IgG humana se puede detectar usando anticuerpos anti-IgG humana unidos a fosfatasa alcalina y se puede revelar con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co, St. Louis, MO).

La tecnología de presentación en fagos se puede utilizar para producir anticuerpos humanos (y fragmentos de los mismos). Véase McCafferty. *Nature*. (1990); 348: 552-553 y Griffiths AD y col. *EMBO*. (1994); 13: 3245-3260. De acuerdo con esta técnica de anticuerpos, los genes del dominio variable se clonan en fase con una proteína principal o secundaria del envoltorio de un bacteriófago filamentosos como M13 o fd y se muestran (normalmente con la ayuda de un fago auxiliar) como fragmentos de antígeno de unión funcional de los mismos en la superficie de la partícula del fago. La selección basada en las propiedades funcionales del anticuerpo dará como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta estas propiedades. La técnica de presentación en fagos se puede usar para seleccionar anticuerpos específicos de antígeno a partir de bibliotecas realizadas con células B humanas aisladas de individuos que padecen una enfermedad o trastorno descrito anteriormente o, alternativamente, a partir de donantes humanos no inmunizados (véase Marks; *J.Mol.Bio.* 1991; 222: 581-597). Cuando se requiere que un anticuerpo humano intacto comprenda un dominio constante es necesario volver a clonar el fragmento derivado del fago obtenido en un vector de expresión de mamífero que comprenda las regiones constantes deseadas y establecer estirpes celulares estables que las expresen.

La técnica de maduración por afinidad (Marks; *Bio/Technol.* 10 (1992); 10: 779-783) se puede usar para mejorar la afinidad de la unión del anticuerpo humano primario mediante el reemplazo secuencial de los dominios variables H y L con dominios variables de las cadenas con variantes presentes en la naturaleza y la selección sobre la base de la mejora de las afinidades de unión. Las variantes de esta técnica, como la "impronta del epítomo", también están disponibles: véase el documento WO93/06213. Véase también Waterhouse. *Nucl.Acids Res.* 15 (1993)21: 2265-2266.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o una combinación de anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos de acuerdo con el primer aspecto que se formulan junto con

un vehículo farmacéuticamente aceptable. Algunas composiciones incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos de acuerdo con el primer aspecto. Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificaciones farmacéuticamente aceptables por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Para la administración con un anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican inmunógenos están en el intervalo de aproximadamente de 10 ng a 1 g, de 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg, o de 30-300 µg de ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían de 10 a 100, o más, viriones por dosis.

Para aplicaciones terapéuticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un paciente que padece una enfermedad determinada en una cantidad suficiente para detener o inhibir el desarrollo adicional o invertir o eliminar la enfermedad, sus síntomas o marcadores bioquímicos. Para aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un paciente susceptible o con riesgo de una enfermedad en una cantidad suficiente para retrasar, inhibir o prevenir el desarrollo de la enfermedad, sus síntomas y marcadores bioquímicos. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz" o "dosis profilácticamente eficaz". La dosis depende de la enfermedad a tratar, del tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada. Específicamente, en el tratamiento de tumores, una "dosis terapéuticamente eficaz" puede inhibir el crecimiento tumoral en, al menos, aproximadamente un 20 %, o al menos aproximadamente un 40 %, o al menos aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 80 % con respecto a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer puede evaluarse en un modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir mediante ensayos convencionales *in vitro*. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o, alternativamente, mejorar los síntomas en un sujeto.

Una composición de la presente invención puede administrarse con una diversidad de procedimientos conocidos en el estado de la técnica. La vía y modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal, rectal y parenteral. Las formulaciones se pueden preparar por cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica en farmacia, preferentemente en plena conformidad con la regulación de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) de la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, transtraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea subcapsular, intraespinal, inyección epidural e inyección intraesternal e infusión.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. El vehículo puede ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, un anticuerpo o fragmento del mismo, molécula biespecífica y multiespecífica, puede recubrirse con un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de entrega microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como el vinil acetato de etileno, los polianhídridos, el ácido poliglicólico, el colágeno, los poliortoésteres y el ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de dichas formulaciones se describen mediante, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Para administrar un compuesto de la invención por determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y soluciones de tampón acuoso. Los liposomas incluyen emulsiones agua-en-aceite-en-agua CGF, así como liposomas convencionales (Strejan y col. *J. Neuroimmunol.* (1984); 7: 27). Cuando el compuesto activo está protegido adecuadamente, según se ha descrito anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable.

Los vehículos típicos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersiones. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en el estado de la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. Compuestos activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas típicas deben ser estériles, esencialmente isotónicas y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Deben ser fluidas de forma que sean fácilmente inyectables y deben conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. En muchos casos, se prefiere incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede inducirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, las sales de monoestearato y la gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada y estéril del mismo.

Estas composiciones también pueden contener excipientes tales como conservantes, agentes humectantes, antioxidantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto por procedimientos de esterilización, citados anteriormente, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares, (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las composiciones terapéuticas también pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, en una realización preferente, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, una microbomba de infusión implantable para dispensar la medicación con una dosificación controlada, y similares.

Cuando los compuestos de la presente invención se administran como productos farmacéuticos a seres humanos y animales, pueden administrarse solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, del 0,01 al 99,5 % (o del 0,1 al 90 %) de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Procedimientos y usos de la invención

Los anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos frente a S100A4 humana o murina y derivados o conjugados de los mismos, de acuerdo con el primer aspecto, tienen utilidades de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, tejidos, órganos, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o en un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir, monitorizar o diagnosticar una diversidad de trastornos.

El término "sujeto" incluye seres humanos y animales no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates y primates no humanos, ovejas, perros, conejos, ratas, ratones, vacas, pollos, anfibios y reptiles. Excepto cuando se indica, los términos "paciente" o "sujeto" se utilizan indistintamente.

Los procedimientos se pueden utilizar para tratar cualquier tipo de cáncer, incluyendo pero no limitado a, cáncer de mama, cáncer de próstata, linfoma, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer de colon, melanoma, melanoma maligno, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, carcinoma primario de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, glioma, glioblastoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, el cáncer de pulmón de células no microcíticas, carcinoma de cabeza y cuello, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, carcinoma de pulmón, carcinoma de células pequeñas de pulmón, tumor de Wilms, carcinoma cervical, carcinoma testicular, carcinoma de vejiga, carcinoma pancreático,

carcinoma de estómago, carcinoma de colon, carcinoma de próstata, carcinoma genitourinario, carcinoma de tiroides, carcinoma esofágico, mieloma, mieloma múltiple, carcinoma adrenal, carcinoma de células renales, carcinoma de endometrio, carcinoma cortical suprarrenal, insulinoma pancreático maligno, carcinoma carcinoide maligno, coriocarcinoma, micosis fungoide, hipercalcemia maligna, hiperplasia cervical, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia granulocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia de células pilosas, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Kaposi, policitemia vera, trombocitosis esencial, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma osteogénico, macroglobulinemia primaria y retinoblastoma. En algunas realizaciones, las células cancerosas tratadas son metastásicas. En otras realizaciones, las células cancerosas tratadas son resistentes a los agentes anticancerosos o antiangiogénicos.

En particular, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención, pueden utilizarse para el tratamiento de tumores, en el que el tumor se selecciona entre el grupo que consiste en: carcinoma de mama, carcinoma de próstata, carcinoma de pulmón, carcinoma colorrectal, carcinoma pancreático, carcinoma renal, carcinoma gástrico, carcinoma de ovario, carcinoma papilar de tiroides, melanoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de vejiga, carcinoma invasivo liposarcoma, neuroblastoma, carcinoma escamoso de esófago, osteosarcoma, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma escamoso oral, carcinoma de endometrio, el meduloblastoma y cualquier otro tumor que exprese S100A4.

En particular, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención pueden utilizarse para el tratamiento de la nefropatía, la artritis reumatoide, hipertensión pulmonar, psoriasis y cualesquiera otras enfermedades mediadas por S100A4.

La evidencia del papel de S100A4 en el desarrollo o la mediación de la nefropatía se ha proporcionada por Inoue, T., Okada, H., Takenaka, T., Watanabe, Y. y Suzuki, H. 2009 (*A case report suggesting the occurrence of epithelial-mesenchymal transition in obstructive nephropathy Clin Exp Nephrol* 13, 385-388); Yamaguchi, Y. y col. 2009 (*Epithelial-mesenchymal transition as a potential explanation for podocyte depletion in diabetic nephropathy Am J Kidney Dis* 54, 653-664.); Le Hir, M., Hegyi, I., Cueni-Loffing, D., Loffing, J. y Kaissling, B. 2005 (*Characterization of renal interstitial fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells in healthy and inflamed rodent kidneys. Histochem. Cell Biol* 123, 335-346); entre otros.

La evidencia del papel de S100A4 en el desarrollo o la mediación en la artritis reumatoide se ha proporcionada por Bo G. y col. 2009 (*Analyses of differential proteome of human synovial fibroblasts obtained from arthritis. Clin. Rheumatol.* 28, 191-199); Oslejsková, L. y col. 2009 (*Metastasis-inducing S100A4 protein is associated with the disease activity of rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford)* 48, 1590-1594); Masuda, K. y col. 2002 (*Molecular profile of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis depends on the stage of proliferation. Arthritis Res* 4, R8); entre otros.

La evidencia del papel de S100A4 en el desarrollo o la mediación en la hipertensión pulmonar se ha proporcionado por Peng, T. y col. 2009 (*Plasma levels of S100A4 in portopulmonary hypertension. Biomarkers* 14, 156-160); Hodge, S. y col. 2009 (*Posttransplant bronchiolitis obliterans syndrome is associated with bronchial epithelial to mesenchymal transition. Am. J. Transplant* 9, 727-733); Spiekerkoetter, E. y col. 2008 (*Reactivation of gammaHV68 induces neointimal lesions in pulmonary arteries of S100A4/Mts1-overexpressing mice in association with degradation of elastin. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 294, L276-289); Brisset, A.C. y col. 2007 (*Intimal smooth muscle cells of porcine and human coronary artery express S100A4, a marker of the rhomboid phenotype in vitro. Circ. Res* 100, 1055-1062); Lawrie, A. y col. 2005 (*Interdependent serotonin transporter and receptor pathways regulate S100A4/Mts1, a gene associated with pulmonary vascular disease. Circ. Res* 97, 227-235); Merklinger, S.L. y col. 2005 (*Increased fibulin-5 and elastin in S100A4/Mts1 mice with pulmonary hypertension. Circ. Res* 97, 596-604); Greenway, S. y col. 2004 (*S100A4/Mts1 produces murine pulmonary artery changes resembling plexogenic arteriopathy and is increased in human plexogenic arteriopathy. Am. J. Pathol* 164, 253-262); entre otros.

La evidencia del papel de S100A4 en el desarrollo o la mediación en la psoriasis se ha proporcionado por Zibert, JR, Skov, L. Thyssen JP, Jacobsen GK, Grigorian M. 2010 (*Significance of the S100A4 protein in psoriasis. J Invest Dermatol.* 130 (1): 150-60); Eckert RL, Broome AM, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K. 2004 (*J Invest Dermatol.* 123 (1): 23-33); entre otros.

El término "tratamiento" incluye la administración de los compuestos o agentes de la presente invención para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de una enfermedad, aliviar los síntomas o detener o inhibir el desarrollo adicional de la enfermedad, estado o trastorno. El tratamiento puede ser profiláctico (para evitar o retrasar la aparición de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o supresión o alivio terapéutico de los síntomas tras la manifestación de la enfermedad.

Kits-de-partes

La presente invención se refiere adicionalmente a un producto que contenga un anticuerpo o fragmento del mismo o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se presentan en el presente

documento y un agente anticancerígeno como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de tumores.

5 Cuando los anticuerpos contra S100A4 se administran junto con otro agente, los dos pueden administrarse simultánea, separada o secuencialmente. Por tanto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinado con otros agentes. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, la terapia de combinación puede incluir una composición de anticuerpo de la presente invención con al menos un agente antitumoral u otra terapia convencional, tal como el tratamiento por radiación.

10 Este agente antitumoral u otra terapia convencional incluyen, sin limitación, agentes de modulación de la apoptosis, antineoplásicos quimioterápicos, agentes inmunoterápicos, antimicrobianos, antivíricos, antifúngicos, agentes antiinflamatorios, así como la intervención quirúrgica y radioterapia.

15 Un número de agentes anticancerígenos adecuados se contemplan para su combinación o coadministración para tratar, prevenir, o mejorar cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente, enfermedades, o trastornos tales como: agentes que inducen la apoptosis; polinucleótidos (por ejemplo, antisentido, ribozimas, ARNip); polipéptidos (por ejemplo, enzimas y anticuerpos); miméticos biológicos (por ejemplo, gosispol o numéricos de BH3), agentes que se unen (por ejemplo, oligomerizan o forman complejos) con S100A4, alcaloides, agentes alquilantes, antibióticos antitumorales; antimetabolitos, hormonas, compuestos de platino; anticuerpos monoclonales o policlonales (por ejemplo, anticuerpos conjugados con fármacos anticancerosos, toxinas, defensinas), toxinas, radionucleidos, modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, interferones (por ejemplo, IFN-alfa) e interleucinas (por ejemplo, IL-2)); agentes para la inmunoterapia adaptativa, factores de crecimiento hematopoyético, agentes que inducen la diferenciación celular tumoral (por ejemplo, todos los ácidos trans-retinoicos); reactivos de terapia génica (por ejemplo, reactivos de terapia antisentido y nucleótidos), vacunas tumorales, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores del proteosoma: moduladores de la NF-KB; compuestos anti-CDK; inhibidores de HDAC y similares.

25 Los agentes de modulación de la apoptosis incluyen, sin limitarse a, la radiación (por ejemplo, rayos X, rayos gamma, rayos UV), factores relacionados con el factor de necrosis tumoral (TNF) (por ejemplo, las proteínas receptoras de la familia del TNF, ligandos de la familia del TNF, TRAIL, anticuerpos contra TRAILR1 o TRAILR2); inhibidores de cinasa (por ejemplo, inhibidor del receptor cinasa de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), inhibidor del receptor cinasa del factor de crecimiento vascular (VEGFR), inhibidor del receptor cinasa del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), inhibidor del receptor cinasa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), inhibidores de cinasas Bcr-Abl (tales como mesilato de imatinib); moléculas antisentido, anticuerpos (por ejemplo, rituximab, trastuzumab, ibritumomab, tiuxetano y bevacizumab), antiestrógenos (por ejemplo, el raloxifeno y el tamoxifeno), antiandrógenos (por ejemplo, flutamida, bicalutamida, finasterida, aminoglutetimida, ketoconazol y corticosteroides), inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) (por ejemplo, celecoxib, meloxicam, NS-398 y antiinflamatorios no esteroideos (AINE)); fármacos antiinflamatorios (por ejemplo, butazolidina, dexametasona, hidroxicloloroquina, oxifenbutazona, fenilbutazona, prednisolona, prednisona), fármacos quimioterápicos en cáncer (por ejemplo, irinotecán, fludarabina, dacarbazina, mitoxantrona, gemtuzumab, ozogamicina, fosfato de etopósido, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, fluorouracilo, doxorubicina, gemcitabina, bortezomib, gefitinib, bebacizumab o paclitaxel); moléculas de señalización celular; ceramidas y citocinas; estaurosporina y similares. Los agentes antineoplásicos o antihiperproliferativos incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos y productos naturales (por ejemplo, compuestos derivados de hierbas y otras plantas y animales).

40 Los agentes alquilantes incluyen, sin limitación: 1) mostazas de nitrógeno (por ejemplo, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcolisina) y clorambucilo), 2) etileniminas y metilmelaminas (por ejemplo, hexametilmelamina y tiotepa), 3) sulfonatos de alquilo (por ejemplo, busulfán), 4) nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, lomustina, semustina y estreptozocina) y 5) triacenos (por ejemplo, dacarbazina; dimetiltriazenoimidazolcarboxamida).

45 Los antimetabolitos incluyen, sin limitación: 1) análogos del ácido fólico (por ejemplo, metotrexato (ametofterina)); 2) análogos de la pirimidina (por ejemplo, fluorouracilo, floxuridina y citarabina) (arabinósido de citosina) y 3) análogos de la purina (por ejemplo, mercaptopurina, tioguanina y pentostatina).

50 Los agentes quimioterápicos incluyen, sin limitación: 1) alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinblastina (VLB), vincristina), 2) epipodofilotoxinas (por ejemplo, etopósido y tenipósido), 3) antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina C)); 4) enzimas (por ejemplo, L-asparaginasa), codificado de la respuesta biológica (por ejemplo, interferón-alfa), 6) complejos coordinadores de platino (por ejemplo, cisplatino (cis-DDP) y carboplatino); 7) antracenedionas (por ejemplo, mitoxantrona), 8) ureas sustituidas (por ejemplo, hidroxiurea), 9) derivados de metilhidrazina (por ejemplo, procarbazona (N-metilhidrazina, MIH)); 10) supresores de la corteza suprarrenal (por ejemplo, el mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida), 11) adrenocorticoesteroides (por ejemplo, prednisona), 12), progestinas (por ejemplo, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol); 13) estrógenos (por ejemplo, dietilestilbestrol y etinilestradiol); 14) antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno); 15) andrógenos (por ejemplo, propionato de testosterona y fluoximesterona); 16) antiandrógenos (por ejemplo, flutamida); y 17) análogos de hormonas liberadoras de gonadotropina (por ejemplo, leuprolida).

Otros agentes anticancerígenos convencionales incluyen, sin limitarse a, adriamicina, 5-fluorouracilo, etopósido, camptotecina, actinomicina D, mitomicina C, cisplatino, docetaxel, gemcitabina, carboplatino, oxaliplatino, bortezomib, gefitinib, bevacizumab, agentes desmetilantes, inhibidores de HER-2, inhibidores de IGF-IR, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inhibidores de YEGFR, inhibidores de mTOR, inhibidores de la mitosis, inhibidores de Smad y taxanos. Estos agentes pueden prepararse y utilizarse individualmente, en combinación de composiciones terapéuticas, en kits, o en combinación con agentes inmunoterápicos y similares.

Puede administrarse cualquier tipo de radiación a un paciente, a condición de que la dosis de radiación sea tolerada por el paciente, sin efectos secundarios negativos inaceptables. Los tipos adecuados de radioterapia incluyen, por ejemplo, ionizante (electromagnética) (por ejemplo, rayos X o rayos gamma) o la terapia de radiación con haz de partículas (por ejemplo, radiación de alta energía lineal).

La presente divulgación también se refiere a:

[1]. Una secuencia aislada de aminoácidos que comprende una secuencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3.

[2]. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 3.

[3]. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un polipéptido S100A4 humano o murino producido mediante la inmunización de un mamífero con un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 3.

[4]. El anticuerpo o fragmento del mismo de [2] o [3], en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se selecciona entre un anticuerpo humano o un fragmento del mismo; un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo; un anticuerpo policlonal o un fragmento del mismo; un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo; un anticuerpo Fab; y un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo.

[5]. Un anticuerpo monoclonal en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende un polipéptido de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 1, o dicho anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada polipeptídica que comprende la SEQ ID NO: 2.

[6]. Un anticuerpo monoclonal que comprende regiones marco conservadas (FR) y regiones determinantes de complementariedad (CDR), en el que el anticuerpo monoclonal comprende una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2.

[7]. El anticuerpo monoclonal de [5] o [6], en el que el anticuerpo monoclonal se selecciona entre un anticuerpo humano; un anticuerpo humanizado; y un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo.

[8]. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con [5], [6] o [7], en el que dicho anticuerpo monoclonal:

- a) solamente reacciona con la proteína S100A4 humana o murina; o
- b) bloquea un mecanismo de acción de la proteína S100A4 humana o murina; o
- c) bloquea *in vitro* o *in vivo* la actividad funcional de la proteína S100A4 humana o murina; o
- d) bloquea un efecto promigratorio inducido por la proteína S100A4 humana o murina o por una proteína S100A4 humana o murina combinada con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células endoteliales; o
- e) bloquea el crecimiento tumoral; o
- f) bloquea el desarrollo del tumor; o
- g) bloquea la angiogénesis tumoral; o
- h) bloquea la diseminación celular y el establecimiento metastásico; o
- i) bloquea las células madre cancerosas; o
- j) cualquier combinación de las anteriores de a) a i).

[9]. Un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que comprende la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, en el que dicho anticuerpo o fragmento es monovalente o bivalente.

[10]. Una estirpe celular de hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal de acuerdo con [5], [6], [7], [8] o [9].

[11]. Un anticuerpo monoclonal obtenible por una estirpe celular de hibridoma depositada con el número de acceso 10022401 en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC).

[12]. Un polinucleótido aislado en el que dicho polinucleótido aislado comprende la SEQ ID NO: 4 que codifica las FR y CDR de la cadena ligera de la región variable de un anticuerpo monoclonal, o dicho polinucleótido aislado comprende la SEQ ID NO: 5 que codifica las FR y CDR de la cadena pesada de la región variable de un anticuerpo monoclonal.

[13]. Un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID NO: 6 que codifica una región del epítipo de la

proteína S100A4 humana.

[14]. Un procedimiento para la fabricación de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con [5], [6], [7], [8], [9] o [11], comprendiendo dicho procedimiento:

- 5 (i) la inmunización de un ratón con la proteína purificada S100A4 humana o murina o con la proteína purificada S100A4 humana o murina combinada con un agente eficaz para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno;
- (ii) la producción de una o más células de hibridoma;
- (iii) la selección de una o más células cuyos sobrenadantes:

- 10 a) reaccionan solamente con una proteína S100A4 humana o murina; o
- b) bloquean un mecanismo de acción de una proteína S100A4 humana o murina; o
- c) bloquean *in vitro* o *in vivo* la actividad funcional de una proteína S100A4 humana o murina; o
- d) bloquean un efecto promigratorio inducido por una proteína S100A4 humana o murina o por una proteína S100A4 humana o murina combinada con VEGF en las células endoteliales; o
- 15 e) bloquean el crecimiento tumoral; o
- f) bloquean el desarrollo de tumores; o
- g) bloquean la angiogénesis tumoral; o
- h) bloquean la diseminación celular y el establecimiento metastásico; o
- i) bloquean las células madre cancerosas; o
- 20 j) cualquier combinación de las anteriores de a) a i).

(iv) la producción de una estirpe celular específica de cualquiera de las células seleccionadas de la etapa iii); y

(v) el aislamiento del anticuerpo monoclonal a partir de dicha estirpe celular.

25 [15]. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal de acuerdo con [5], [6], [7], [8], [9] o [11] y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[16]. La composición farmacéutica de acuerdo con [15], que comprende adicionalmente un agente quimioterápico.

[17]. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con [2], [3] o [4], o el anticuerpo monoclonal de acuerdo con [5], [6], [7], [8], [9] o [11], para su uso como un medicamento.

30 [18]. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con [2], [3] o [4], o el anticuerpo monoclonal de acuerdo con [5], [6], [7], [8], [9] o [11], para su uso como un medicamento para el tratamiento de tumores.

[19]. Uso de un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con [2], [3] o [4], o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con [5], [6], [7], [8], [9] o [11], para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumores.

35 [20]. Un procedimiento para tratar tumores que comprende la administración a un sujeto que necesite de dicho tratamiento de una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal de acuerdo con [5], [6], [7], [8], [9] o [11].

40 [21]. El anticuerpo o fragmento del mismo o anticuerpo monoclonal de acuerdo con [18], el uso de acuerdo con [19], o el procedimiento para el tratamiento de tumores de acuerdo con [20], en el que el tumor se selecciona entre el grupo que consiste en: carcinoma de mama, carcinoma de próstata, carcinoma de pulmón, carcinoma colorrectal, carcinoma pancreático, carcinoma renal, carcinoma gástrico, carcinoma de ovario, carcinoma papilar de tiroides, melanoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de vejiga, carcinoma liposarcoma invasivo, neuroblastoma, carcinoma escamoso de esófago, osteosarcoma, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma escamoso oral, carcinoma de endometrio, meduloblastoma y cualesquiera otros tumores mediados por S100A4.

45 [22]. Uso de un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con [2], [3] o [4], o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con [5], [6], [7], [8], [9] o [11], como un marcador para la identificación, localización, evaluación, diagnóstico, pronóstico o monitorización de un tumor o cualquier otra enfermedad mediada por S100A4 en un sujeto.

50 [23]. Un producto que contiene un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con [2], [3] o [4], o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con [5], [6], [7], [8], [9] o [11] y un agente antineoplásico, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de tumores.

[24]. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un polipéptido de S100A4 humano o murino para su uso como un medicamento para el tratamiento de tumores.

La invención se describe a continuación en el presente documento por medio de los ejemplos siguientes, que han de interpretarse como meramente ilustrativos y no limitantes de la invención.

Ejemplos**PREPARACIÓN DE LA PROTEÍNA S100A4 RECOMBINANTE HUMANA Y DEL ANTICUERPO MONOCLONAL****Ejemplo 1: Origen y preparación de estirpes celulares tumorales y cultivos**

5 Se cultivaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, Lonza) en gelatina Tipo B de piel bovina al 1 % (Sigma) en un medio celular endotelial basal EBM (Lonza), complementado con hEGF, hidrocortisona, extracto de cerebro bovino y gentamicina (EGM, Lonza) y FCS al 10 % (Invitrogen). Las HUVEC se utilizaron entre los pases 6-9 y todos los experimentos se realizaron en el 80-85 % de confluencia, con el mismo lote de células.

10 Se cultivaron estirpes celulares de adenocarcinoma de colon HCT-116 (ATCC, N.º: CCL-247) y adenocarcinoma de páncreas MiaPACA-2 (ECACC N.º: 85062806) en DMEM con alto contenido en glucosa (PAA) complementado con FCS al 10 % (Invitrogen) y L-glutamina 2 mM.

Las células de mieloma se cultivaron en RPMI 1640 (PAA) complementado con FCS al 10 % (PAA; origen australiano) y GlutaMAX™-I 2 mM (Invitrogen).

Todas las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada y estaban libres de micoplasmas, que se evaluaron con el kit de ensayo de micoplasmas EZ-PCR (Biological Industries).

15 Ejemplo 2: Origen y preparación de los animales

20 Los ratones para la producción de anticuerpos (ratones hembra BALB/cAnNHsd; de 6 semanas de edad) y para los modelos tumorales (ratones desnudos: ratones hembra atímicos (Hsd: desnudos atímicos-Foxnlnu; 6-7 semanas de edad) eran de Harlan Laboratories Models, SL (Barcelona, España). Los ratones desnudos se mantuvieron en ambiente estéril en jaulas con microaislador y se les nutrió con alimento esterilizado y agua a demanda. Todas las manipulaciones se realizaron en una campana de flujo laminar.

Ejemplo 3: Obtención de la proteína recombinante humana S100A4

Un fragmento que codifica la S100A4 humana completa se obtuvo por RT-PCR a partir de ARNm de la estirpe celular HCT-116, derivada de adenocarcinoma de colon humano. Los cebadores específicos usados en la PCR fueron:

25 SEQ ID NO: 22 5'-ACTCACATATGGCGTGCCCTCTGGAGAAGGCCCTGGATGTG-3' y
SEQ ID NO: 23 5'-ACTCATGAGCTCATCATTTCTTCTGGGCTGCTTATCTGGGAA-3'

30 El ADNc de la S100A4 se clonó en el sitio *NdeI* del vector de expresión bacteriano pET28a(+) (Novagen) y los clones positivos se seleccionaron y se confirmaron por secuenciación de ADN. Esta construcción se transformó en células competentes de *E. coli* Tuner™ (DE3) (Novagen) y la proteína se indujo con isopropil-D-tiogalacto-piranosido 1 mM (IPTG, Sigma) durante 6 horas. A continuación, las bacterias se recogieron y se lisaron por tratamiento con ultrasonidos en el tampón A (lisozima 100 µg/ml, NaCl 0,5 M, Na₂HPO₄·2H₂O 10 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 10 mM e imidazol 10 mM pH 7,5). El lisado se clarificó mediante centrifugación y se filtró a través de una columna de afinidad HiTrap™ Chelating (Amersham). La proteína se eluyó con el tampón B (NaCl 0,5 M, Na₂HPO₄·2H₂O 10 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 10 mM e imidazol 300 mM, pH 7,5). En algunos experimentos la cola de histidina se escindió con la proteasa trombina (Novagen, la secuencia de reconocimiento es Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, con sitio de escisión entre Arg y Gly). Por tanto, la longitud final completa de la proteína S100A4 recombinante tiene una secuencia adicional de Gly-Ser-His en el extremo N-terminal. Después de la digestión, el resto de la cadena de poli-his se separó en la columna de afinidad HiTrap™ Chelating (Amersham) utilizando la cola de poli-histidina y la pureza del sobrenadante que contenía la proteína recombinante S100A4 se verificó por SDS-12 % (p/v) en electroforesis en gel de poliacrilamida.

40

Ejemplo 4: Obtención de anticuerpos monoclonales contra S100A4

La fusión del anticuerpo monoclonal (mAb), la detección por ELISA y la subclonación se realizaron usando tecnologías convencionales. El mantenimiento, expansión y el aumento a escala de los cultivos se realizó en un ambiente humidificado (94 % de aire y 6 % de CO₂) a 37 °C.

45 Para cada anticuerpo monoclonal, cinco animales se inmunizaron con S100A4 recombinante humana de acuerdo con el siguiente protocolo. Se usaron cincuenta microgramos de proteína S100A4 diluida en PBS (NaCl137 mM, KCl 2,8 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,2) como una emulsión con adyuvante completo de Freund (Sigma) para la inmunización inicial subcutánea (s.c.) y con adyuvante incompleto de Freund (Sigma) para las inyecciones posteriores en los días 19 y 35 (s.c.). Diez días después de la tercera inyección, se obtuvieron sueros y se analizaron. A día 51, al ratón con el título de suero más alto se le administró por vía intravenosa un refuerzo final de 25 µg de proteína S100A4 diluida en PBS.

50

La fusión se realizó cuatro días después de la última inyección. Los Mab obtenidos derivaron de una fusión de células de mieloma con células de bazo del ratón seleccionado en una relación 1/10, respectivamente, utilizando

PEG-1500 (Roche Diagnostics) como inductor de la fusión. A continuación, las células se sembraron en placas de 96 micropocillos en medio que contenía HAT (Invitrogen) para la selección de híbridos.

5 Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron para determinar la reactividad con S100A4 recombinante humana mediante ELISA. Los micropocillos de las placas MaxiSorp 96 (NUNC) se recubrieron con 50 µl de proteína S100A4 (3 µg/ml en PBS) y se dejaron durante la noche a 4 °C. Después de lavar con PBS y bloquear (1 % de leche desnatada en PBS; 1 h; 37 °C), se añadieron 50 µl de los sobrenadantes de los hibridomas a cada pocillo y se incubaron durante dos horas a 37 °C. Después de lavar, a temperatura ambiente, cinco veces con PBS-HT sin calcio y magnesio (NaCl 274 mM, KCl 2,8 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Tween-20 al 0,1 %, pH 7,2), las inmunoglobulinas unidas se detectaron con IgG/IgM anti-ratón de cabra conjugado a HRP (Jackson ImmunoResearch) utilizando tetrametilbencidina 3,3',5,5' (TBM, Sigma) como sustrato.

10 Se eligieron los pocillos con una densidad óptica mayor que tres veces el ruido de fondo de la placa para la clonación. Los clones correspondientes a los anticuerpos monoclonales 5C3 (código interno 5C3-1B8-1F4; ECACC 10022401), 1E2 (código interno 1E2-2H4-2G8; ECACC 11051803), 6B9 (código interno 6B9-1E8-2A8; ECACC 11051801), **8B6** (código interno 8B6-2F6-1H9-1S10; ECACC 11051804) y 5A3 (código interno 5A3-4A6-5B6; ECACC 11051802) fueron seleccionados para el análisis *in vitro* e *in vivo* y se subclonaron mediante dilución limitante. Sólo aquellos subclones que crecieron a 0,1 y 0,01 célula por pocillo se consideraron adecuados para la expansión, se adaptaron a medio DMEM/F12 (PAA) y se congelaron.

15 Para la purificación a gran escala, las células de hibridoma se cultivaron en DMEM/F12 que contenía un 10 % de suero bovino fetal (PAA, origen australiano) y 2 mM de L-glutamina (GlutaMAX™-I, Invitrogen) en frasco de cultivo de 175 cm². Cuando la concentración celular alcanzó 0,8x10⁶ células/ml (viabilidad superior al 85 %), el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron dos veces con medio DMEM/F12 sin suero. A continuación, se añadieron 50 ml de un medio que contenía DMEM/F12 al 80 %, CDHybridoma (Invitrogen) al 20 % y 2 mM de L-glutamina a cada matraz y se incubaron durante 96 horas. Al final, se recogió el medio sin suero, se centrifugó y se congeló hasta la purificación.

20 Se obtuvieron seis litros de sobrenadante sin suero a partir del hibridoma. Después de la filtración, la purificación se realizó mediante una columna de afinidad de 5 ml HiTrap Protein G HP (Amersham). El anticuerpo eluido se concentró y se diafiltró en PBS con Amicon® Ultra-15 dispositivos centrífugos de filtro con baja unión a membrana Ultracra® (30000 NMWL, Millipore). Los anticuerpos finales acondicionados se cuantificaron 280 nm.

25 **Ejemplo 5: Caracterización de la reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales 5C3, 1E2,6B9, 8B6, 5A3: los anticuerpos monoclonales reaccionan solamente con S100A4**

30 Los anticuerpos monoclonales 5C3, 1E2, 6B9, **8B6** y 5A3 se analizaron para determinar su reacción cruzada contra otros miembros de la familia S100: S100A1, S100A2, S100A6 recombinantes humanas (Abnova), S100A7 y S100P recombinantes humanas (clonadas a partir de la estirpe celular de adenocarcinoma de mama MDA-MD-468 y de la estirpe celular de adenocarcinoma de cuello uterino HeLa, respectivamente, en la división Biomed de LEITAT) y la S100A4 recombinante murina (clonada a partir de la estirpe celular de adenocarcinoma fibroblástico de embrión de ratón NIH/3T3 en la división Biomed de LEITAT). Los isotipos de inmunoglobulina de los anticuerpos monoclonales contra S100A4 se determinaron utilizando el kit de tipificación de inmunoglobulina de ratón (Sigma).

35 La selección de los anticuerpos por ELISA contra S100A4 humana purificada, S100A1 humana, S100A2 humana, S100A6 humana, S100A7 humana, S100P humana y S100A4 murina mostró que los anticuerpos monoclonales 5C3, 1E2, 5A3 y 8B6 reaccionaron con S100A4 humana y murina y con la misma intensidad, mientras que 6B9 solamente reconocía la S100A4 humana (Tabla 1)

Tabla 1: La especificidad de 5C3, 1E2, 6B9, 8B6, 5A3 analizada por ELISA.

| Patrón de reacción del mAb en el ELISA | | | | | | | | | | |
|---|---------------|---------|---------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--|
| Anticuerpo | Inmunógeno | Isotipo | S100A4 humana | S100A4 De ratón | S100A1 humana | S100A2 humana | S100A6 humana | S100A7 humana | SI OOP humana | |
| 5C3 | S100A4 humana | IgG1 | ++++ | ++++ | - | - | - | - | - | |
| 1E2 | S100A4 humana | IgG2a | ++++ | ++++ | na | na | na | - | - | |
| 6B9 | S100A4 humana | IgG1 | ++++ | - | na | na | na | - | - | |
| 8B6 | S100A4 humana | IgG1 | ++++ | ++++ | na | na | na | - | - | |
| 5A3 | S100A4 humana | IgG1 | ++++ | ++++ | na | na | na | - | - | |
| ++++ Reacción positiva, - ninguna reacción, na no analizada | | | | | | | | | | |

Ejemplo 6: Caracterizaciones inmunitarias del 5C3 por transferencia Western

Las muestras de células y tumores se aclararon dos veces con PBS y se lisaron inmediatamente en tampón de lisis celular (NaCl 150 mM, Igepal CA630 al 1 %, EDTA 5 mM, PMSF 100 µg/ml, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM y Tris 50 mM pH 7,4) enfriado con hielo. Los lisados se clarificaron por centrifugación y la concentración de proteína se cuantificó con el reactivo de Bradford (Bio-Rad). Los extractos totales (50 µg) se resolvieron por electroforesis en un gel de poliacrilamida (PAGE)-SDS al 12 % en condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de PVDF (BioTrace™ Pali Corporation). Las membranas se bloquearon durante 1 hora en TBS más Tween-20 al 0,1 % con leche desnatada en polvo del 5 %, se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente y después con los anticuerpos secundarios durante 1 hora en tampón de bloqueo; se lavaron tres veces durante 10 minutos en TBS más Tween-20 al 0,1 % después de cada incubación. Se desarrollaron señales usando reactivos de detección de transferencia Western ECL™ (Amersham) y se expusieron a Hyperfilm™ ECL (Amersham).

Las concentraciones de los anticuerpos fueron las siguientes: monoclonal de ratón anti-S100A4 humana 5C3 (Leitat Biomed Division) a 1 µg/ml; anti-tubulina policlonal de conejo (ICN Biomedicals) a una dilución de 1:5000; anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón (Jackson ImmunoResearch) a 0,04 µg/ml y policlonal de cabra anti-conejo (Sigma) a una dilución 1:25000, como anticuerpos secundarios.

La figura 1a-1b muestran el patrón de expresión de la proteína S100A4 en varias estirpes celulares tumorales, en la estirpe embrionaria de fibroblastos de ratón NIH3T3 y en muestras de tumores provenientes de modelos de xenoinjerto derivados de las estirpes celulares HCT116, MiaPACA-2 y BxPC3. Las estirpes celulares de adenocarcinoma de páncreas humanas MiaPACA-2 y Panel mostraron mayores niveles de expresión que BxPC3, otra estirpe celular humana de adenocarcinoma pancreático. Como se puede observarse en la Figura 1b, los tumores derivados de BxPC3 mostraron mayores niveles de expresión de S100A4 que la propia BxPC3 en cultivo. Este aumento de los niveles de S100A4 podría indicar una función directa de la proteína en la generación de tumores malignos invasivos (observada también en las secciones inmunohistológicas). Estos niveles elevados pueden ser producidos por las propias células tumorales o por las células del estroma tumoral. Las estirpes celulares de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 y 468 mostraron niveles insignificantes de la proteína S100A4, pero se puede observar en la figura 1c que las células madre cancerosas derivadas de un cultivo de la MDA-MB-231 mostraron niveles elevados de expresión de S100A4. Las estirpes celulares de adenocarcinoma de colon Colo 205 y los tumores derivados de HCT116, otra estirpe celular de adenocarcinoma de colon, mostraron altos niveles de expresión de la proteína. En la figura 1a se muestra que el 5C3 no solamente reacciona con la S100A4 humana, sino también con la S100A4 murina (fibroblastos de ratón NIH-3T3).

Los mismos resultados obtenidos con el 5C3 podrían hacerse extensibles también para los otros mAb con excepción del 8B6 que no reaccionó con la proteína S100A4 desnaturalizada (datos no mostrados).

Ejemplo 7: Caracterizaciones inmunitarias del 5C3 por inmunohistoquímica

Se desparafinaron cortes de cuatro micrómetros de grosor provenientes de bloques de tumores, se rehidrataron con diferentes grados de alcoholes y se procesaron. En resumen, la recuperación del antígeno se realizó en un horno microondas durante 15 minutos en citrato de sodio 10 mM, pH 6,0 con Tween-20 al 0,05 %. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó con una solución de H₂O₂ al 3 % en agua destilada y los portaobjetos se incubaron en suero normal de cabra al 5 % durante 30 min para evitar la tinción inespecífica. A continuación, se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios convenientemente diluidos. Los anticuerpos que se utilizaron fueron los siguientes: el anticuerpo monoclonal de ratón 5C3 (1 µg/ml), el anticuerpo policlonal de conejo anti-S100A4 de Dako (dil 1:200) y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli-histidina de R&D Systems (5 µg/ml). Posteriormente, las secciones se incubaron con los anticuerpos biotinilados apropiados de: cabra anti-IgG de ratón (H+L) (Vector Laboratories) a 2 µg/ml y cabra anti-IgG de conejo (H+L) (Vector Laboratories) a 2 µg/ml, durante 60 minutos y con el complejo ABC (DAKO) durante 30 min a temperatura ambiente. Como cromógeno se utilizó NovaRed (Dako). Como control negativo, un anticuerpo monoclonal no relacionado (anti-poli-histidina) se sustituyó por el anticuerpo primario.

El análisis inmunohistoquímico (Figura 2) usando el anticuerpo monoclonal 5C3 mostró un nivel mayor de expresión de S100A4 en el frente invasivo que en el centro del tumor derivado de modelos de xenoinjerto de adenocarcinoma pancreático de Panel o BxPC3. Además, los análisis a gran aumento (X120) mostraron la presencia de la proteína no solamente en el citoplasma, sino también en los núcleos de las células tumorales. Cuando se utilizó el anticuerpo más referenciado contra S100A4 para el análisis inmunohistoquímico (anticuerpo policlonal de conejo de Dako), se observó el mismo patrón de distribución.

Tomando todos estos resultados, los inventores afirmaron que los anticuerpos monoclonales sometidos a ensayo se pueden utilizar como una herramienta de análisis para diagnóstico.

Ejemplo 8: 5C3 modula la actividad de la metaloproteinasas de matriz MMP9 inducida por S100A4

Un procedimiento cuantitativo de zimografía de sustrato proteico está validado como indicador de la destrucción de la matriz extracelular, la movilización de los factores de crecimiento, el procesado de moléculas de superficie y se correlaciona con el procedimiento migratorio e invasivo de las células tumorales y del estroma. En los pacientes con

cáncer, esta técnica convencional de laboratorio parece reflejar una medida de los grados clínicos de la enfermedad. Los análisis de la actividad de las MMP, en suero de pacientes, pueden tener valor diagnóstico para discriminar los subgrupos de cáncer y determinar mayores potencialidades metastásicas.

- 5 Las HUVEC se cultivaron en EBM más complementos (EGM) y FCS al 10 %, en placas de cultivo de 24 pocillos. Antes de la estimulación, las células se mantuvieron 4 horas en EBM en ausencia de suero u otros complementos. Después, se añadió S100A4 (0,3-1-3 μM) en EBM al cultivo para analizar su capacidad para aumentar la secreción de formas activas de metaloproteinasas de matriz (MMP). Para someter a ensayo el efecto inhibitor del 5C3, bloqueando la estimulación inducida por S100A4, se incubó el anticuerpo a 1-2 μM con S100A4 (1 μM) durante una hora, antes de añadir los dos al cultivo. Después de 24 horas a 37 °C, los sobrenadantes se centrifugaron para retirar los residuos celulares. Después, se añadieron 10 μl de tampón de carga Laemmli sin agentes reductores (80 mM Tris-HCl, pH 6,8, SDS al 4 %, glicerol al 10 % y azul de bromofenol al 0,01 %) a 10 μl de cada uno de los sobrenadantes clarificados, que se cargaron sin hervir en un gel de SDS-poliacrilamida al 8 % copolimerizado con gelatina de piel porcina del tipo A (Sigma) a una concentración final de 1 mg/ml. Después de la electroforesis, el SDS se retiró lavando tres veces el gel durante 15 minutos con Tritón X-100 al 2,5 % en H₂O. La activación se visualizó tras 48 horas de incubación del gel a 37 °C en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, CaCl 10 mM y NaN₃ al 0,02 %. La tinción se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente con naftol negro amido al 0,1 % (Sigma) en ácido acético, metanol y agua en una proporción en volumen de 1:3:6. Después, los geles se lavaron con una solución decolorante, hasta que las bandas aparecían transparentes sobre un fondo oscuro. Las bandas se cuantificaron con el software de formación de imágenes ImageJ NIH.
- 10
- 15
- 20 Se intentó determinar parte del mecanismo de acción de S100A4 en la inducción de la migración de células endoteliales analizando la producción y activación de las MMP en los medios condicionados de HUVEC. Los medios condicionados de células tratadas con S100A4 (0,3-1-3 μM) contenían formas sustancialmente más activas de la proteína MMP9, que las células no tratadas. Esta actividad fue dependiente de la dosis (Figura 3 (A)). Estas diferencias se detectaron a las 24 h de tratamiento. La actividad de la MMP9 en los medios se redujo por completo cuando el anticuerpo anti-S100A4 5C3 se añadió junto a la proteína S100A4 (Figura 3 (B)). S100A4 no indujo cambios en la actividad de MMP2 en este modelo celular.
- 25

Se puede especular, que la actividad proteolítica potenciada detectada en los medios acondicionados de HUVEC tratadas con S100A4, se correlaciona con la estimulación de la migración cuando VEGF más S100A4 se añade al cultivo. Esto sería dependiente, al menos en parte, de la actividad de la MMP9.

30 **Ejemplo 9: S100A4 y VEGF ejercen un efecto sinérgico sobre la migración de las células HUVEC y los anticuerpos monoclonales 5C3, 1E2, 6B9, 8B6 y 5A3 bloquean esta actividad**

Las células endoteliales (CE) revisten todos los vasos de cualquier organismo mamífero. Las CE son las células responsables de iniciar la formación de nuevos vasos bajo un estímulo específico que puede originarse por una patología o una situación fisiológica. La migración de las CE se acepta en la actualidad como un paso clave en la formación de la neovasculatura. En consecuencia, los estudios sobre migración con CE son totalmente indicativos del perfil de la actividad terapéutica de fármacos antiangiogénicos.

35

Se usaron placas de cultivo de 24 pocillos con insertos provistos de una membrana de PET porosa de 8 μm de diámetro y opacas a la luz (Transwell HTS FluoroBlok™ Multiwell Insert Systems de Becton Dickinson) para evaluar la actividad migratoria. Las superficies superior e inferior de las membranas Transwell se cubrieron con 15 $\mu\text{g/ml}$ de colágeno de tipo I (Upstate) durante 2 horas a 37 °C. Se sembraron las células endoteliales (5x10⁴ de HUVEC) suspendidas en 100 μl de EBM en ausencia de suero u otros complementos, después del recubrimiento de colágeno, en la parte superior de cada cámara Transwell y se incubaron durante 4 horas a 37 °C. A continuación, se añadió S100A4 (1 μM), sola o en combinación con VEGF (3 ng/ml) en EBM al compartimiento inferior de las placas de 24 pocillos para someter a ensayo su capacidad quimiotáctica. Para someter a ensayo el efecto inhibitor de los anticuerpos monoclonales anti-S100A4 (5C3, 1E2, 6B9, 8B6, 5A3) (Leitat Biomed Division), varias concentraciones de los anticuerpos (ver Fig 4) se incubaron durante 2 horas con S100A4 y VEGF o VEGF solo, antes de añadirlos a la cámara baja del Transwell para iniciar la migración. Se usó otro anticuerpo monoclonal anti-S100A4, denominado 5H4 (Leitat Biomed Division), para comparar la actividad. Después de 24 horas a 37 °C, las células que habían migrado a la parte inferior del Transwell se incubaron con calceína-AM 5 μM (Calbiochem) durante 25-30 minutos a 37 °C. Las células que migraron se contaron bajo un microscopio óptico a un aumento de X10. Para realizar la comparación entre los grupos, se utilizó el ensayo no paramétrico U de Mann-Whitney con dos colas. Diferencias para valores de P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativas.

40

45

50

Este experimento demostró por primera vez que la combinación de S100A4 y otro factor angiogénico (VEGF) incrementó de forma sinérgica la actividad migratoria de las HUVEC. Se sometió a ensayo S100A4 a una dosis de 1 μM , sin presentar una actividad significativa en comparación con el control EBM. La incubación de las HUVEC con 3 ng/ml de VEGF solo aumentó la migración en 2,4 veces en comparación con el EBM. Cuando el VEGF (3 ng/ml) se combinó con S100A4 (1 μM), se observó efecto sinérgico (Figura 4). En particular, cuando la S100A4 recombinante (1 μM) se añadió junto con el VEGF (3 ng/ml), la migración se incrementó en un 235 % en comparación con el efecto del VEGF solo.

55

También se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-S100A4 (5C3, 1E2, 6B9, 8B6, 5A3) para inhibir la actividad promigratoria de S100A4. Como se muestra en la Figura 4 (A), 250 nM de 5C3 abolió el efecto sinérgico de la combinación de VEGF (3 ng/ml) y S100A4 (1 µM) sobre la migración de las HUVEC. La inhibición de la migración debido a 5C3 fue dependiente de la dosis. El anticuerpo no afectó la migración inducida por VEGF solo. Por el contrario, otro anticuerpo monoclonal anti-S100A4, denominado 5H4, no mostró efecto neutralizante. La Figura 4B muestra la actividad inhibitoria de otros anticuerpos monoclonales contra S100A4 comparada con el 5C3, trabajando todos ellos a 2 µM. En su conjunto, junto con los datos bioquímicos, estos resultados demuestran que 5C3, 1E2, 6B9, 8B6 y 5A3 se unen específicamente a S100A4 y muestran una neutralización *in vitro* de la actividad inducida por S100A4 sobre la migración de las HUVEC.

10 **Ejemplo 10: 5C3 bloquea el desarrollo de tumores MiaPACA-2 y HCT116 en ratones desnudos**

Se usan habitualmente tumorales de xenoinjertos para evaluar respuestas, donde los resultados quimioterápicos tienen relevancia clínica en la quimioterapia del cáncer. Los xenoinjertos tumorales son, por tanto, buenos modelos para correlacionar datos de xenoinjertos con los datos clínicos. El ensayo de fármacos con diferentes tipos de tumores xenotrasplantados han demostrado que la respuesta de estos xenoinjertos obtenidos en animales inmunodeficientes es comparable a la práctica clínica. Además, xenoinjertos de un tipo de tumor en particular permiten identificar agentes de actividad clínica conocida frente a la enfermedad.

La estirpe celular MiaPACA-2 de adenocarcinoma de páncreas humano y la estirpe celular HCT116 de adenocarcinoma colorrectal humano en crecimiento exponencial se procesaron con tripsina-EDTA (0,05 %/0,02 %) (Invitrogen), se lavaron y se examinó para determinar la viabilidad mediante exclusión con colorante azul de tripano. La viabilidad fue mayor al 95 %. Para el crecimiento del tumor primario, se inyectaron subcutáneamente (5×10^6 o 1×10^6 células MiaPACA-2 o HCT116 respectivamente en 0,1 ml de DMEM rico en glucosa) en los flancos de ratones desnudos. Cuando el volumen tumoral se situó entre 65-160 mm³ para MiaPACA-2 y volúmenes entre 155-370 mm³ para HCT116 se dividió a los ratones en dos grupos de diez ratones cada uno (MiaPACA-2) o siete ratones para cada grupo (HCT116), de manera que el tamaño tumoral medio fue igual entre los grupos (aproximadamente 100 mm³ para MiaPACA-2 o 22 mm³ para HCT116). El crecimiento del tumor se monitorizó por medición de los diámetros del tumor con calibradores y el volumen tumoral se calculó usando una fórmula aproximada de una elipse alargada:

$$\text{volumen} = (D \times d^2) / 2$$

donde D es el eje mayor del tumor y d es el más corto. Los ratones se trataron con vehículo (PBS) o con el anticuerpo, i.p. tres veces por semana a 25 mg/Kg/100 µl de PBS estéril, iniciando el tratamiento en el volumen definido (100 mm³ y 220 mm³). Al final del experimento los animales se sacrificaron, los tumores se extirparon quirúrgicamente, se pesaron y se incluyó una mitad de los tumores en OCT para su posterior análisis por inmunotinción con CD31, mientras que la otra mitad se fijó en formaldehído para su posterior análisis. Se recogieron muestras de sangre de animales con tumor MiaPACA-2 o HCT116 al final del experimento (todos los animales), con material tratado con EDTA. Inmediatamente después, las muestras de plasma se centrifugaron durante 10 min a 5000 rpm, a temperatura ambiente y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Se hicieron comparaciones entre grupos usando el ensayo no paramétrico U de Mann-Whitney con dos colas. Diferencias para valores de P menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativas.

Los inventores investigaron el efecto del 5C3 en el desarrollo tumoral subcutáneo de MiaPACA-2 o de HCT116 en ratones desnudos atímicos (Figura 5). Tanto las estirpes celulares MiaPACA-2/HCT116 como los tumores desarrollados de MiaPACA-2/HCT116 en ratones desnudos muestran altos niveles de expresión y secreción de la proteína S100A4 en los medios de cultivo y en la sangre, respectivamente (datos no mostrados). Debido a la función de S100A4 en los tumores pancreáticos y colorrectales y la evidencia de que la proteína es secretada por estas estirpes celulares, los inventores decidieron probar este modelo para someter a ensayo la actividad *in vivo* del anticuerpo monoclonal 5C3.

Los xenoinjertos se implantaron, se cultivaron y los animales portadores de tumores se separaron de forma aleatoria y se trataron como se ha descrito anteriormente. El tratamiento se inició 17 días después de la implantación para las MiaPACA-2 (media de volumen del tumor de cada grupo de más de 100 mm³) (día 0) y los tumores se resecaron a los 30 días después del tratamiento. El tratamiento se inició 23 días después de la implantación para las HCT116 (media de volumen del tumor de cada grupo de más de 220 mm³) (día 0). Se administró 5C3 por vía intraperitoneal (25 mg/kg), tres veces por semana con el esquema de dosificación como se muestra en la Figura 6 (ejemplo para MiaPACA-2).

La figura 5A muestra el análisis comparativo de la actividad antitumoral del 5C3 a lo largo del tiempo para animales con tumores de MiaPACA-2. El grupo control (vehículo) mostró un crecimiento tumoral máximo, con una media del 592 % de volumen tumoral relativo respecto al volumen inicial (antes del tratamiento). Los cambios en el volumen tumoral de ratones inyectados con 5C3 mostraron una máxima media en el volumen tumoral relativo del 274 % (día 30) con respecto del volumen inicial. En relación con estos datos, los inventores han observado (Figura 5 (B)) que el tratamiento con 5C3, también indujo una disminución estadísticamente significativa en el peso del tumor en

comparación con el grupo control al final del experimento (día 30). Además, estas diferencias se reflejan en la relación T/C tanto a nivel de volumen como de peso del tumor calculado; 46 % y 38 % respectivamente.

5 Actividad antitumoral del 5C3 a lo largo del tiempo para animales con tumores de HCT116. El grupo control (vehículo) mostró un crecimiento tumoral máximo, con una media del 557 % del volumen tumoral relativo respecto al volumen inicial (antes del tratamiento). Los cambios en el volumen tumoral de ratones inyectados con 5C3 mostraron una máxima media en el volumen tumoral relativo del 511 % (día 21) con respecto del volumen inicial. En relación con estos datos, hemos observado (datos no presentados) que el tratamiento con 5C3 indujo una disminución en peso del tumor comparado con el grupo control al final del experimento (día 21) mayor que la observada en la evaluación del volumen tumoral. Además, estas diferencias se reflejan en las relaciones T/C (grupo de tratamiento frente a control) tanto a nivel de volumen tumoral como de peso del tumor calculado; 91 % y 74 % respectivamente.

10 Por tanto, los inventores demostraron por primera vez que el tratamiento con un anticuerpo monoclonal contra S100A4 indujo un marcado retraso estadísticamente significativo en el crecimiento tumoral en comparación con el grupo no tratado (vehículo) para tumores humanos pancreáticos de MiaPACA-2 y un aumento de necrosis intratumoral en tumores humanos colorrectales de HCT116 afectando al peso del tumor.

15 **Ejemplo 11: 5C3 bloquea la formación de la microvasculatura tumoral**

Las pruebas experimentales sugieren que el crecimiento de un tumor más allá de un cierto tamaño requiere de angiogénesis, que a su vez también puede permitir la metástasis. Para investigar como la angiogénesis tumoral se correlaciona con la metástasis en los carcinomas, los investigadores cuentan los microvasos (capilares y vénulas) y se clasifica la densidad de los microvasos en carcinomas invasivos en estadios iniciales. El recuento de microvasos y el grado de densidad también se correlaciona con metástasis a distancia. La evaluación de la angiogénesis tumoral puede resultar útil, por tanto, en la selección de los pacientes con carcinoma de mama precoz para una terapia agresiva.

25 Se incluyeron tumores del modelo de xenoinjerto de MiaPACA-2 en OCT (Tissue-Tek®, Sakura) y se congelaron. Se analizaron criosecciones (de 5 µm), correspondientes a la parte central de cada tumor. Las secciones se fijaron en acetona/cloroformo (1:1) a -20 °C durante 5 min, se secaron durante la noche a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se trataron 10 min a 4 °C en una cámara oscura con H₂O₂ (0,03 %) en PBS. A continuación, las secciones se lavaron con PBS y se bloquearon durante 20 min a 4 °C usando PBS-BSA (2 %) más suero de conejo (5 %) (Vector) y con la solución de bloqueo avidina-biotina (Dako) durante 10 minutos cada uno a 4 °C. Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario, un anticuerpo monoclonal de rata anti-ratón dirigido contra CD31 (dil 1:200, BD PharMingen) diluido en tampón de bloqueo. Después de la incubación las secciones se incubaron con un anticuerpo policlonal biotinilado anti-rata como anticuerpo secundario (dil 1:500, Vector) durante 30 min a temperatura ambiente y se incubaron con el reactivo ABC (Pierce) durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, las secciones se incubaron con NovaRed (Vector) durante 20 minutos a 4 °C, se tiñeron con hematoxilina de Harris (Sigma) durante 10 segundos y se montaron en medio de montaje no acuoso DPX (Sigma).

La cuantificación de la angiogénesis se realizó usando dos criterios:

$$D.M.V (p.v./mm^2) = 10^6 \times \frac{\text{Suma de los vasos de cada tumor (imagen A+ imagen B+...+imagen N)}}{\text{Área de un tumor en } \mu m^2 \text{ (área A + área B +... + area N)}}$$

$$A.A \text{ (área fraccional de vasos) - } \frac{\text{Área de vasos de cada tumor (imagen A + imagen B + ...+imagen N)}}{\text{Área de un tumor en } \mu m^2 \text{ (área A + área B + ... + area N)}}$$

Dependiendo del tamaño de los tumores se procesaron y se analizaron entre 8 y 39 imágenes por sección, usando el software de imagen NIH ImageJ.

40 Se realizaron comparaciones entre grupos utilizando el ensayo no paramétrico de la U de Mann-Whitney de dos colas. Diferencias para valores de *P* menores de ,05 se consideraron estadísticamente significativas.

Los inventores analizaron si el 5C3 realmente afectó la angiogénesis tumoral *in vivo*. La evaluación de la angiogénesis tumoral se realizó en base a la inmunotinción de CD31 y a dos aproximaciones analíticas: la densidad de microvasos (D.M.V.) y el área fraccional de los vasos (AA).

45 La Tabla 2 muestra todos los datos tomados, animal por animal, en relación con el número de imágenes analizadas para cada tumor subcutáneo de MiaPACA-2, el área total de los vasos, el número de vasos, el área total del tumor y las cuantificaciones D.M.V. y %AA.

Tabla 2: Comparación de la cuantificación de la angiogénesis tumoral entre el grupo control y el grupo tratado con el 5C3.

| | N.º imágenes | Área de vasos (mm ²) | N.º de vasos | Área del tumor (mm ²) | D.M.V. (p.v./mm ²) | % A. A. |
|-----------|--------------|----------------------------------|--------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------|
| G1 n.º 1 | 17 | 163232,8 | 445 | 9835265,19 | 45,25 | 1,66 |
| G1 n.º 2 | 23 | 91308,11 | 420 | 13570619,39 | 30,95 | 0,67 |
| G1 n.º 5 | 23 | 186919,87 | 647 | 12925880,79 | 50,05 | 1,45 |
| G1 n.º 6 | 20 | 120203,31 | 395 | 10467766,84 | 37,73 | 1,15 |
| G1 n.º 7 | 30 | 128668,51 | 428 | 17116234,97 | 25,01 | 0,75 |
| G1 n.º 8 | 8 | 57991,79 | 177 | 4401690,15 | 40,21 | 1,32 |
| G1 n.º 9 | 23 | 191851,7 | 691 | 13201926,3 | 52,34 | 1,45 |
| G1 n.º 10 | 39 | 201871,47 | 758 | 21987453,76 | 34,47 | 0,92 |

| | N.º imágenes | Área de vasos (mm ²) | N.º de vasos | Área del tumor (mm ²) | D.M.V. (p.v./mm ²) | % A.A. |
|----------|----------------|----------------------------------|--------------|-------------------------------------|-----------------------------------|--------|
| G2 n.º 1 | 29 | 185583,19 | 514 | 16290934,48 | 31,55 | 1,14 |
| G2 n.º 2 | 19 | 130528,29 | 460 | 10367720,6 | 44,37 | 1,26 |
| G2 n.º 3 | 21 | 62690,42 | 240 | 11861612,23 | 20,23 | 0,53 |
| G2 n.º 4 | 21 | 49860,26 | 203 | 12078084,8 | 16,81 | 0,41 |
| G2 n.º 5 | 26 | 96805,14 | 440 | 14742897,14 | 29,84 | 0,66 |
| G2 n.º 6 | 21 | 84539,29 | 426 | 11757524,57 | 36,23 | 0,72 |
| G2 n.º 7 | 16 | 29042,45 | 158 | 9126560,08 | 17,31 | 0,32 |
| G2 n.º 9 | 14 | 39705,98 | 174 | 7550280,16 | 23,05 | 0,53 |
| | | | | | | |
| | AA (%) Mediana | AA (%) Media | ETM | DMV (p.v./mm ²) Mediana | DMV (p.v./mm ²) Media | ETM |
| G1 (PBS) | 1,23 | 1,17 | 0,13 | 38,97 | 39,50 | 3,33 |
| G2 (5C3) | 0,59 | 0,69 | 0,12 | 26,45 | 27,42 | 3,47 |

G1 (grupo control: vehículo), G2 (grupo de tratamiento con 5C3).
Cuantificaciones de D.M.V. (Densidad microvascular) y AA (Área fraccional de los vasos).

5 Los tumores de los animales tratados con el anticuerpo monoclonal 5C3 mostraron una reducción de aproximadamente el 40 % de la densidad de microvasos y el 30 % de la sección de área ocupada por los vasos en comparación con los animales del grupo control (vehículo). Como se muestra en la Figura 7, estas diferencias en microvasos intratumorales fueron estadísticamente significativas.

10 Los datos experimentales desvelaron que el efecto del 5C3, bloqueando el desarrollo del tumor, podría ser en parte debido a una fuerte reducción de la angiogénesis tumoral.

Ejemplo 12: El tratamiento con 5C3 no induce pérdida de peso corporal o efectos secundarios adversos.

El perfil de peso corporal en los días de administración en el grupo tratado con el 5C3 y en el grupo control con vehículo se controlaron previamente a la administración, a lo largo del experimento. No se detectó pérdida de peso corporal en ningún grupo y no se tuvieron que interrumpir los tratamientos.

15 La Figura 8 muestra los perfiles de peso corporal de los animales a lo largo del experimento. El 5C3 fue bien tolerado a 25 mg/kg en un régimen de dosificación de tres veces a la semana hasta el final del experimento.

El análisis macroscópico de los animales no evidenció anomalías en los órganos. No se observaron efectos secundarios adversos (incoordinación motora, parálisis, ataxia, convulsiones, diarrea, caquexia, eritema, hipotermia, ni mortalidad) en ningún animal a lo largo del experimento.

20 Ejemplo 13: Cuantificación plasmática de S100A4 en el modelo de xenoinjerto tumoral

Existe la necesidad de detección temprana de tumores y metástasis, procedimiento crítico para mejorar el tratamiento en pacientes con cáncer. La detección de biomarcadores moleculares utilizando ensayos no invasivos simples como los procedimientos de cuantificación basados en muestras de sangre es una de las mayores necesidades clínicas para detectar la presencia de un tumor y monitorizar la terapia del cáncer.

25 Los niveles plasmáticos de S100A4 se cuantificaron por el procedimiento del sándwich ELISA. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos (Maxisorb, Nunc) con 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal 5C3, diluido en PBS (100 µl/pocillo) durante 24 horas a 4 °C. Después de retirar el recubrimiento, las placas se lavaron dos veces con PBS y se incubaron 1 hora a 37 °C en tampón de bloqueo (PBS que contenía 1 % de leche desnatada).

Las muestras de plasma se diluyeron 1:4 en tampón de dilución (PBS-BSA al 4 %), se aplicaron a los pocillos

(100 µl/pocillo) y se incubaron 2 horas a 37 °C. Las placas se lavaron ocho veces con tampón de lavado (PBS-Tween-20 al 0,1 %) y el anticuerpo policlonal de conejo anti-S100A4 (Dako) utilizado como anticuerpo secundario, a la dilución apropiada, se aplicó a los pocillos (100 µl/pocillo) y se incubaron durante 1 h en 37 °C.

5 Las placas se lavaron ocho veces con tampón de lavado, el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma), a la dilución apropiada, se añadió a cada pocillo (100 µl/pocillo) y se incubaron 1 hora a 37 °C. Después de 8 lavados con tampón de lavado, el ELISA se reveló añadiendo 100 µl de sustrato de tetrametilbenzidina (Sigma) y las placas se incubaron 30 min a temperatura ambiente antes de parar con 1 M de HCl. La absorbencia se leyó a 450 nm.

10 La curva convencional para cuantificar las muestras de plasma basal (animales sin tumor), se obtuvo mediante diluciones seriadas de S100A4 murina recombinante en tampón de dilución. La curva convencional para muestras de plasma finales (animales con tumor al final del experimento) se obtuvo mediante diluciones seriadas de S100A4 recombinante humana en tampón de dilución.

15 La Figura 9 muestra la cuantificación de los niveles plasmáticos de S100A4 en animales con tumor subcutáneo (promedio de los volúmenes tumorales entre 600-1000 mm³ aproximadamente) de varias estirpes celulares MiaPACA-2, Colo205, MDA-MB-231 y HCT116. Los datos experimentales demostraron la diferencia consistente entre la expresión basal de la proteína S100A4 en animales sin tumores (basal-02) y la expresión al final del experimento, cuando los animales presentaban tumores.

20 La Figura 9 también muestra los niveles de proteína S100A4 en los animales tratados con el anticuerpo monoclonal 5C3 (modelo de xenoinjertos de tumor de MiaPACA-2 y HCT116) que indica que el tratamiento correspondiente (véase el ejemplo 10) bloquea la totalidad de la proteína S100A4 circulante en plasma.

Ejemplo 14: Determinación epitópica de los anticuerpos monoclonales 5C3, 1E2, 6B9, 8B6 y 5A3

25 La determinación de la región epitópica de reconocimiento de los anticuerpos se evaluó mediante ELISA. Brevemente, la secuencia completa de la proteína S100A4 humana se fraccionó en nueve péptidos solapantes. Se recubrieron placas de 96 pocillos (Maxisorb, Nunc) con 3 µg/ml de cada péptido diluido en PBS (100 µl/pocillo) durante 24 horas a 4 °C. Los anticuerpos anti-S100A4 diluidos a 5 µg/ml en tampón de dilución (PBS-BSA al 1 %) se aplicaron a los pocillos (100 µl/pocillo) y se incubaron 90 minutos a 37 °C. Las placas se lavaron ocho veces con tampón de lavado (PBS-Tween-20 al 0,1 %) y el anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson Immunoresearch), a la dilución apropiada, se añadió a cada pocillo (100 µl/pocillo) y se incubó 30 minutos a 37 °C. Después de ocho lavados con tampón de lavado, el ELISA se reveló añadiendo 100 µl de sustrato de tetrametilbenzidina (Sigma) y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente antes de parar con 1 M de HCl. La absorbencia se leyó a 450 nm.

35 La Tabla 3 muestra la región de S100A4 humana reconocida por los anticuerpos monoclonales funcionales 5C3, 1E2, 6B9, 8B6 y 5A3. El anticuerpo 8B6 no reconoció ninguno de los nueve péptidos lineales diseñados, dando la posibilidad de que reconozca una región conformacional de la proteína. Otro anticuerpo monoclonal contra la S100A4 humana, denominado 5H4, utilizado como control negativo en los ensayos de migración, reconoce una región diferente

(VMVSTFHKYSGKEGDKFKLN) (SEQ ID NO: 26).

Tabla 3: Secuencias de S100A4 reconocidas por los anticuerpos monoclonales.

| Anticuerpo Monoclonal | Secuencia de S100A4 | Número de depósito |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------|
| 5C3 | ELPSFLGKRT (SEQ ID NO: 3) | 10022401 |
| 1E2 | EGFPDKQPRKK (SEQ ID NO: 24) | 11051803 |
| 6B9 | EGFPDKQPRKK (SEQ ID NO: 24) | 11051801 |
| 5A3 | EGFPDKQPRKK (SEQ ID NO: 24) | 11051802 |
| 8B6 | ----- | 11051804 |

Ejemplo 15: Efecto citotóxico de la Gemcitabina y el 5C3

40 El cáncer es un proceso multietapa y multifactorial y, por tanto, las estrategias terapéuticas dirigidas a diferentes dianas moleculares o compartimientos tumorales son actualmente las mejores opciones para combatir esta enfermedad. Se usa ampliamente la quimioterapia convencional como la Gemcitabina, un tratamiento de referencia de primera línea de tratamiento para el cáncer de páncreas avanzado, pero solamente ofrece un beneficio moderado debido a la adquisición de quimiorresistencia y a la aparición de múltiples efectos adversos. Por tanto, es necesario

45 identificar agentes dirigidos menos tóxicos que puedan sensibilizar varios compartimientos tumorales y que, en combinación con la quimioterapia convencional serán más eficaces para matar las células tumorales. Para mejorar el efecto antitumoral y para identificar nuevos reactivos para el tratamiento del cáncer de páncreas, se investigaron los efectos del anticuerpo monoclonal 5C3 en combinación con Gemcitabina en la proliferación celular y la viabilidad en la estirpe celular de cáncer de páncreas humana, MiaPACA-2.

El efecto citotóxico de la Gemcitabina y el anticuerpo monoclonal 5C3 se midió por la actividad hexosaminidasa. Brevemente, células MiaPACA-2 se sembraron en placas de 96 pocillos (5x10³ células/pocillo) en 50 µl de medio DMEM. Veinticuatro horas después, se añadieron 50 µl de medio con varias concentraciones de Gemcitabina sola o en combinación con 5C3 (40 nM 100 nM), a cada pocillo y se cultivaron durante 72 horas más. Después de retirar los medios de cultivo las células se lavaron una vez con PBS. Se añadieron sesenta microlitros de solución de sustrato (p-nitrofenol-N-acetil-beta-D-glucosamida 7,5 mM, citrato de sodio 0,1 M, Triton X-100 al 0,25 %, pH 5,0,) a cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante 2 horas, después de este tiempo de incubación, aparece un color amarillo brillante, las placas se revelan mediante la adición de 90 µl de solución de revelado (Glicina 50 mM, EDTA 5 mM, pH 10,4) y se mide la absorbancia a 450 nm por medio de un espectrofotómetro de exploración de múltiples pocillos. El análisis de datos se realizó normalizando los resultados con el control negativo (células sin tratar), que se consideró como un 100 % de viabilidad.

Las curvas se ajustaron utilizando una ecuación de dosis-respuesta sigmoideal (pendiente variable) y los valores de CE50 se obtuvieron a partir de la ecuación:

$$Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogCE50} - X) * \text{pendiente})})$$

donde X es el logaritmo de la concentración e Y es la respuesta. Y comienza en la parte inferior y va a la zona superior con una forma sigmoidea.

Para evaluar el nivel de interacción (aditivo, sinérgico o el efecto antagonista) entre Gemcitabina y 5C3, se utilizó una variación del procedimiento propuesto por Chou-Talalay. Brevemente, el efecto de la Gemcitabina más 5C3 es cuantificado mediante el índice de combinación (CI):

$$CI = (D) / (Dm)$$

donde

$$(Dm) = \text{Concentración CE50 de Fármaco 1 y } (D) = \text{CE50 (Fármaco 1 + Fármaco 2)}$$

Tabla 4. Determinación de valores (sinergia, adición, antagonismo) usando el índice CI:

| | | | |
|----------|---------------------|-----------|------------------------|
| < 0,1 | Sinergia muy fuerte | 0,90-1,10 | Casi aditivo |
| 0,1-0,3 | Sinergia fuerte | 1,20-1,45 | Antagonismo leve |
| 0,3-0,7 | Sinergia | 1,45-3,3 | Antagonismo |
| 0,7-0,85 | Sinergia moderada | 3,3-10 | Antagonismo fuerte |
| 0,85-0,9 | Sinergia leve | >10 | Antagonismo muy fuerte |

La Fig. 10 muestra el efecto en la viabilidad celular inducido por los tratamientos con Gemcitabina sola y la combinación de Gemcitabina y dos concentraciones del anticuerpo monoclonal 5C3 en la estirpe celular MiaPACA-2. La CE50 para la Gemcitabina fue de 8,356 nM. La combinación con el 5C3 mostró una CE50 de 5,161 nM y 4,586 nM para 40 nM y 100 nM del mAb respectivamente.

La determinación del índice IC mostró valores de 0,61 y 0,54 para la combinación de Gemcitabina con 40 nM y 100 nM de 5C3 que demuestran un efecto sinérgico de los dos compuestos.

Este experimento demostró por vez primera, que la combinación de un anticuerpo monoclonal contra S100A4 junto con el fármaco quimioterápico Gemcitabina puede mejorar sinérgicamente el efecto del fármaco solo. Por esta razón, los anticuerpos monoclonales anti-S100A4 pueden llegar a ser nuevos candidatos para el uso en combinación con fármacos quimioterápicos para el tratamiento de pacientes con cáncer.

Ejemplo 16: S100A4 induce la secreción de IL8 en monocitos THP1 y el anticuerpo monoclonal 5C3 bloquea este efecto.

Las enfermedades inflamatorias crónicas comprenden un gran grupo de trastornos caracterizados por la activación de células mononucleares, tales como monocitos y linfocitos. Una de las características de la inflamación crónica y enfermedades autoinmunitarios es la intensa activación y acumulación de células de monocitos y macrófagos. Los monocitos y macrófagos activados son la fuente más importante de producción de citocinas en la mayoría de los trastornos inflamatorios crónicos. Teniendo en cuenta todos estos hechos, se investigó si el bloqueo de la proteína S100A4 podría ser útil para tratar las enfermedades inflamatorias crónicas donde la activación de monocitos juega un papel fundamental.

Para evaluar el efecto del 5C3 sobre la activación de monocitos, THP-1, una estirpe celular de monocitos humanos se expuso a S100A4 y los niveles de IL-8 secretada se utilizaron como indicador de la activación de los monocitos.

Se cultivaron células de la estirpe celular humana de leucemia monocítica THP-1 (ATCC) en medio de cultivo RPMI 1640 complementado con FCS al 10 % y penicilina/estreptomina al 1 %, a 37 °C en CO2 al 5 % en un incubador humidificado. Las células se cultivaron en placas a 5,0 x 10⁵ células/pocillo. Se incubaron S100A4 y el anticuerpo 5C3 juntos durante 1 hora antes de la adición a los monocitos. Se añadió IgG anti-ratón (específico Fc) siempre en

todos los casos para la prevención de la respuesta del receptor de Fc. Los sobrenadantes de cultivo de las células se recogieron después de 24 h y se almacenaron a -20 °C. Los niveles de IL-8 se analizaron por ELISA sándwich.

La proteína S100A4 activó los monocitos humanos de manera que inducía la liberación de citocinas en una manera dosis respuesta (Figura 11 (A)). Esta respuesta puede bloquearse mediante el anticuerpo monoclonal 5C3 (Figura 11 (B)). Tanto el 5C3 como la IgG anti-ratón en ausencia de S100A4, no tienen efecto sobre los niveles de IL-8 (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren que el 5C3 puede ser útil en el tratamiento de todas las enfermedades inflamatorias crónicas, tales como artritis reumatoide, artritis psoriásica, psoriasis, enfermedades inflamatorias intestinales, arteriosclerosis, esclerosis múltiple, etc, en las que la activación de monocitos desempeñan un papel central en su fisiopatología.

DEPÓSITOS DE MATERIAL BIOLÓGICO

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti-S100A4 5C3-1B8-1F4 se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (Porton Down, Salisbury, OJG SP4, Reino Unido) en las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. Se depositó el 24 de febrero de 2010 y el número asignado a dicho depósito fue 10022401.

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti-S100A4 6B9-1E8-2A8 se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (Porton Down, Salisbury, OJG SP4, Reino Unido) en las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. Se depositó el 18 de mayo de 2011 y el número asignado a dicho depósito fue ECACC 11051801.

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti-S100A4 5A3-4A6-5B6 se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (Porton Down, Salisbury, OJG SP4, Reino Unido) en las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. Se depositó el 18 de mayo de 2011 y el número asignado a dicho depósito fue ECACC 11051802.

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti-S100A4 1E2-2H4-2G8 se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (Porton Down, Salisbury, OJG SP4, Reino Unido) en las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. Se depositó el 18 de mayo de 2011 y el número asignado a dicho depósito fue ECACC 11051803.

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti-S100A4 8B6-2F6-1H9-1H10 se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (Porton Down, Salisbury, OJG SP4, Reino Unido) en las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. Se depositó el 18 de mayo de 2011 y el número asignado a dicho depósito fue ECACC 11051804.

<110> ACONDICIONAMIENTO TARRASENSE

<120> ANTICUERPOS S100A4 Y USOS TERAPÉUTICOS DE LOS MISMOS

<130> P7045PC00

<150> EP10382170.8

<151> 14-06-2010

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región VL del anticuerpo monoclonal 5C3

<400> 1

ES 2 717 908 T3

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Thr Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Región VH del anticuerpo monoclonal 5C3
 <400> 2

Glu Ala Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Gln Glu Thr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Asp Asp Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110

10

Val Ser Ser 115

<210> 3

ES 2 717 908 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

gagctgcca gctcttggg gaaaaggaca 30

5 <210> 7
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región FRL1 del anticuerpo monoclonal 5C3

10 <400> 7

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys 20

15 <210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región CDRL1 del anticuerpo monoclonal 5C3

<400> 8

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

20 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Región FRL2 del anticuerpo monoclonal 5C3

<400> 9

Trp Tyr Leu Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro Glu Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

30 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región CDRL2 del anticuerpo monoclonal 5C3

<400> 10

35 Lys Val Ser Asn Arg Leu Ser 15

<210> 11
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Región FRL3 del anticuerpo monoclonal 5C3

ES 2 717 908 T3

<400> 11

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 12

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región CDRL3 del anticuerpo monoclonal 5C3

<400> 12

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr
 1 5

10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Región FRL4 del anticuerpo monoclonal 5C3

<400> 13

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

20

<210> 14

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región FRH1 del anticuerpo monoclonal 5C3

25

<400> 14

Glu Ala Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Gln
 20 25 30

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región CDRH1 del anticuerpo monoclonal 5C3

<400> 15

Glu Thr Tyr Met His
 1 5

ES 2 717 908 T3

<210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Región FRH2 del anticuerpo monoclonal 5C3
 <400> 16

Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

10 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región CDRH2 del anticuerpo monoclonal 5C3

15 <400> 17

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Asp Asp Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

20 <210> 18
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región FRH3 del anticuerpo monoclonal 5C3
 <400> 18

Lys Ala Ser Ile Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser
 20 25 30

25 <210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Región CDRH3 del anticuerpo monoclonal 5C3
 <400> 19

Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5

35 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 717 908 T3

<223> Región FRH4 del anticuerpo monoclonal 5C3

<400> 20

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

5 <210> 21
<211> 101
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 21

Met Ala Cys Pro Leu Glu Lys Ala Leu Asp Val Met Val Ser Thr Phe
1 5 10 15

His Lys Tyr Ser Gly Lys Glu Gly Asp Lys Phe Lys Leu Asn Lys Ser
20 25 30

Glu Leu Lys Glu Leu Leu Thr Arg Glu Leu Pro Ser Phe Leu Gly Lys
35 40 45

Arg Thr Asp Glu Ala Ala Phe Gln Lys Leu Met Ser Asn Leu Asp Ser
50 55 60

Asn Arg Asp Asn Glu Val Asp Phe Gln Glu Tyr Cys Val Phe Leu Ser
65 70 75 80

Cys Ile Ala Met Met Cys Asn Glu Phe Phe Glu Gly Phe Pro Asp Lys
85 90 95

Gln Pro Arg Lys Lys 100

10 <210> 22
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador directo
<400> 22

actcacatat ggcgtgccct ctggagaagg ccctggatgt g 41

20 <210> 23
<211> 43
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso
<400> 23

ES 2 717 908 T3

Ala Cys Thr Cys Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr Cys Ala Thr Cys Ala
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Cys Thr Thr Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys Thr Gly Cys
 20 25 30

Thr Thr Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Ala
 35 40

5 <210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 24

Glu Gly Phe Pro Asp Lys Gln Pro Arg Lys Lys
 1 5 10

10 <210> 25
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Proteína de fusión que comprende la secuencia de S100A4 humana con una cola amino-terminal
 <400> 25

Gly Ser His Met Ala Cys Pro Leu Glu Lys Ala Leu Asp Val Met Val
 1 5 10 15

Ser Thr Phe His Lys Tyr Ser Gly Lys Glu Gly Asp Lys Phe Lys Leu
 20 25 30

Asn Lys Ser Glu Leu Lys Glu Leu Leu Thr Arg Glu Leu Pro Ser Phe
 35 40 45

Leu Gly Lys Arg Thr Asp Glu Ala Ala Phe Gln Lys Leu Met Ser Asn
 50 55 60

Leu Asp Ser Asn Arg Asp Asn Glu Val Asp Phe Gln Glu Tyr Cys Val
 65 70 75 80

Phe Leu Ser Cys Ile Ala Met Met Cys Asn Glu Phe Phe Glu Gly Phe
 85 90 95

15 Pro Asp Lys Gln Pro Arg Lys Lys 100

<210> 26
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 26

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-S100A4 específico con actividad antiangiogénica o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo, en el que el anticuerpo es producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804.
2. Una estirpe celular de hibridoma seleccionada entre el grupo que consiste en una estirpe celular depositada con el número de acceso ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804.
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Un anticuerpo anti-S100A4 específico que tiene actividad antiangiogénica o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo, en el que el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en:
- 15 (i) Un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia ELPSFLGKRT (SEQ ID NO: 3),
(ii) Un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia EGFPDKQPRKK (SEQ ID NO: 24) y
20 (iii) Un anticuerpo producido por el hibridoma ECACC 11051804 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en metástasis, una enfermedad en la que se produce una angiogénesis patógena y una enfermedad inflamatoria.
5. Un anticuerpo o fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad es cáncer.
- 25 6. Un conjugado que comprende un anticuerpo anti-S100A4 específico que tiene actividad antiangiogénica o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo, en el que el anticuerpo es producido por el hibridoma ECACC 11051804 y un segundo componente seleccionado entre el grupo de:
- 30 (a) un agente antiangiogénico
(b) un agente antimetastásico
(c) un agente citotóxico
(d) un agente antiinflamatorio
7. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre una metástasis, una enfermedad en la que se produce una angiogénesis patógena y una enfermedad inflamatoria.
- 35 8. Composición que comprende un anticuerpo anti-S100A4 específico que tiene actividad antiangiogénica o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo, en la que el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en:
- 40 (i) Un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia ELPSFLGKRT (SEQ ID NO: 3),
(ii) Un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia EGFPDKQPRKK (SEQ ID NO: 24) y
(iii) Un anticuerpo producido por el hibridoma ECACC 11051804 y un antimetabolito.
9. Composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el antimetabolito es gemcitabina.
- 45 10. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en la que el anticuerpo anti-S100A4 específico es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804.
11. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer o metástasis.
- 50 12. Un procedimiento *in vitro* para diagnosticar cáncer o una enfermedad asociada con inflamación en un sujeto que comprende:
- (a) detectar los niveles de la proteína S100A4 en un biofluido de dicho sujeto por medio de la utilización de un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo que consiste en ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento de

unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo
(b) comparar dichos niveles con un valor de referencia

en el que los niveles aumentados de la proteína S100A4 con respecto al valor de referencia son indicativos de que el sujeto padece cáncer o una enfermedad asociada con inflamación.

5 13. Un procedimiento para la detección de S100A4 en una muestra que comprende:

- (i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener S100A4 con un anticuerpo anti-S100A4 específico o un fragmento del mismo como se define en la reivindicación 1 y
- (ii) detectar la formación de complejos inmunitarios entre S100A4 y el anticuerpo o el fragmento del mismo

10 en el que la detección de los complejos inmunitarios entre S100A4 y el anticuerpo es indicativa de la presencia de S100A4 en la muestra.

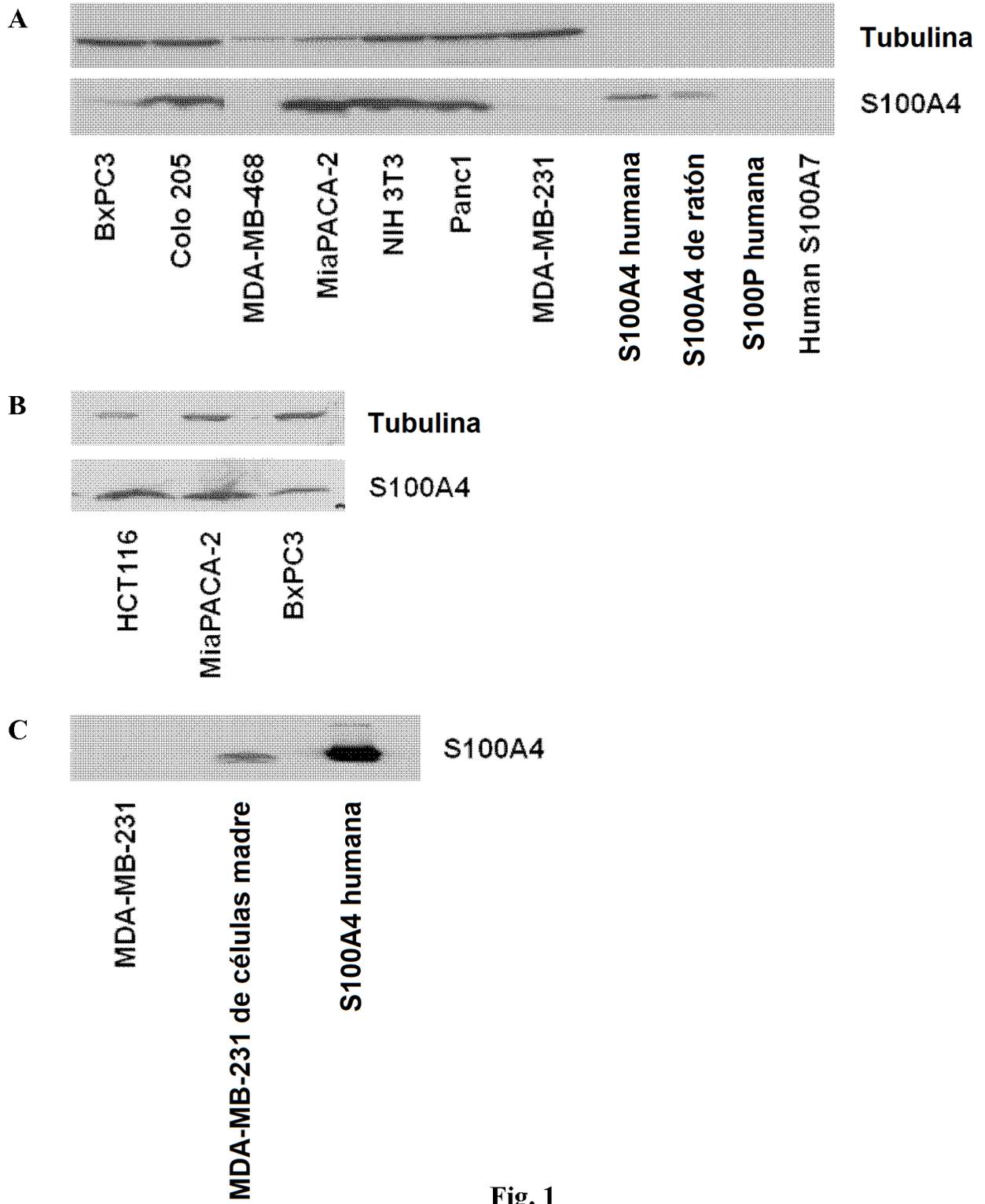
14. Un kit para el diagnóstico de cáncer o una enfermedad asociada con inflamación en un biofluido que comprende al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.

15. Un procedimiento *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto diagnosticado con cáncer que comprende

15 a. determinar los niveles de la proteína S100A4 en un biofluido de dicho sujeto por medio de la utilización de un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo que consiste en ECACC 10022401, ECACC 11051801, ECACC 11051802, ECACC 11051803 y ECACC 11051804 o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo y
b. comparar los niveles de la proteína S100A4 con un valor de referencia

20 en el que un aumento de los niveles de proteína S100A4 con respecto a un nivel de referencia es indicativo de que el paciente se ha de tratar con un anticuerpo anti-S100A4 específico que tiene actividad antiangiogénica o un fragmento de unión a S100A4 del mismo que conserva la actividad antiangiogénica de dicho anticuerpo en el que el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 25
- (a) un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia ELPSFLGKRT (SEQ ID NO: 3),
 - (b) un anticuerpo que reconoce un epítipo de S100A4 que comprende la secuencia EGFPDKQPRKK (SEQ ID NO: 24) y
 - (c) un anticuerpo producido por el hibridoma EC ACC 11051804.



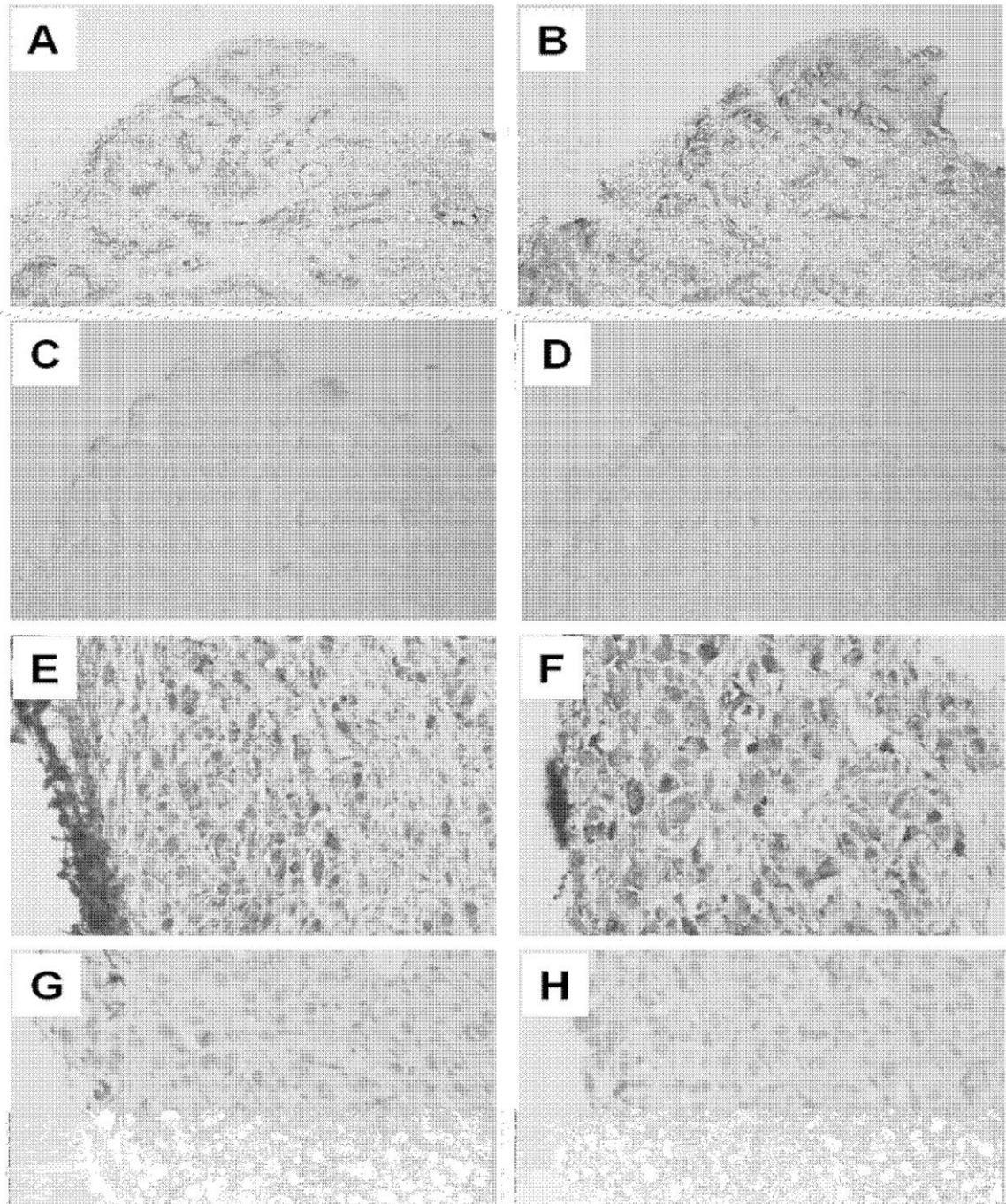
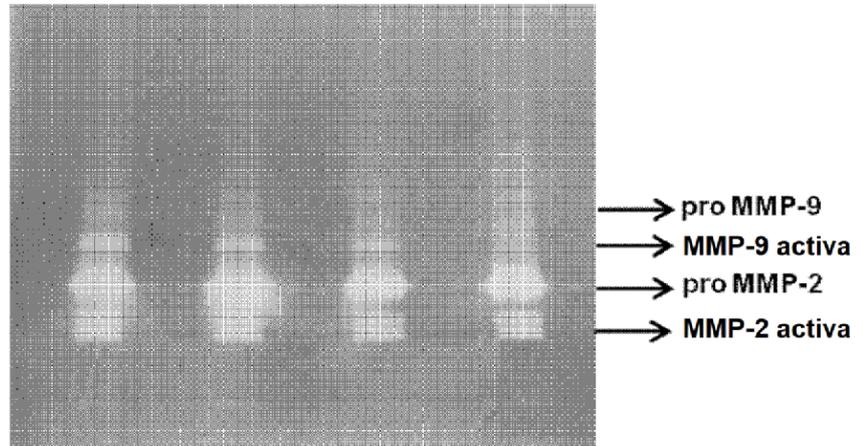


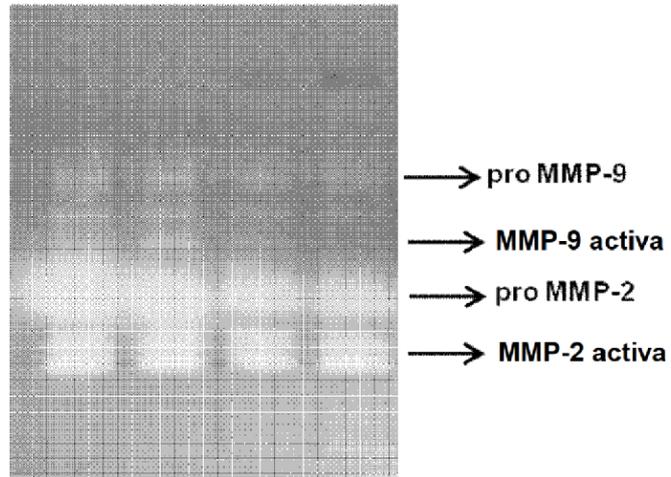
Fig. 2

A



S100A4 (μM): 3 1 0,3 --

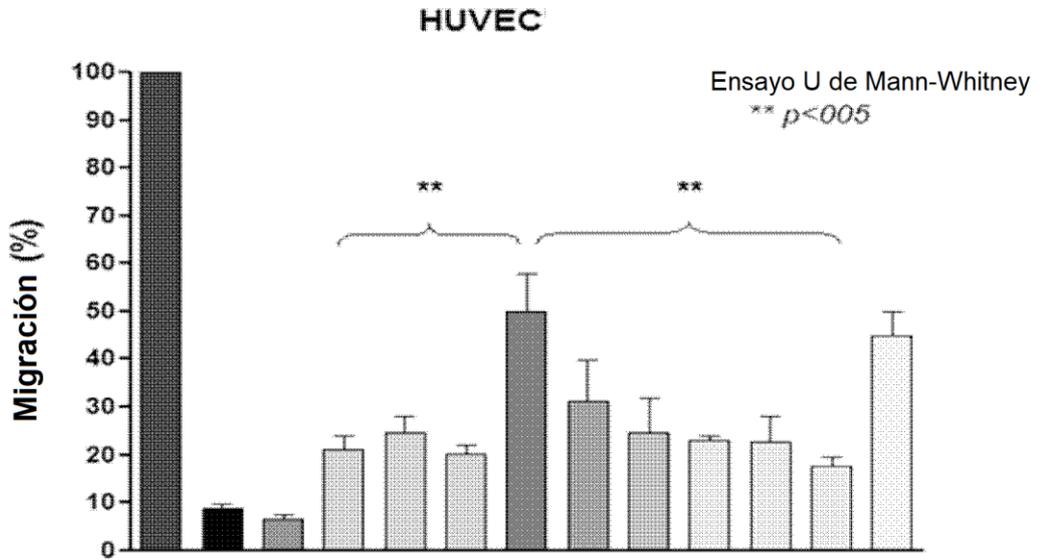
B



S100A4 (μM): -- 1 1 1
 5C3 (μM): -- -- 1 2

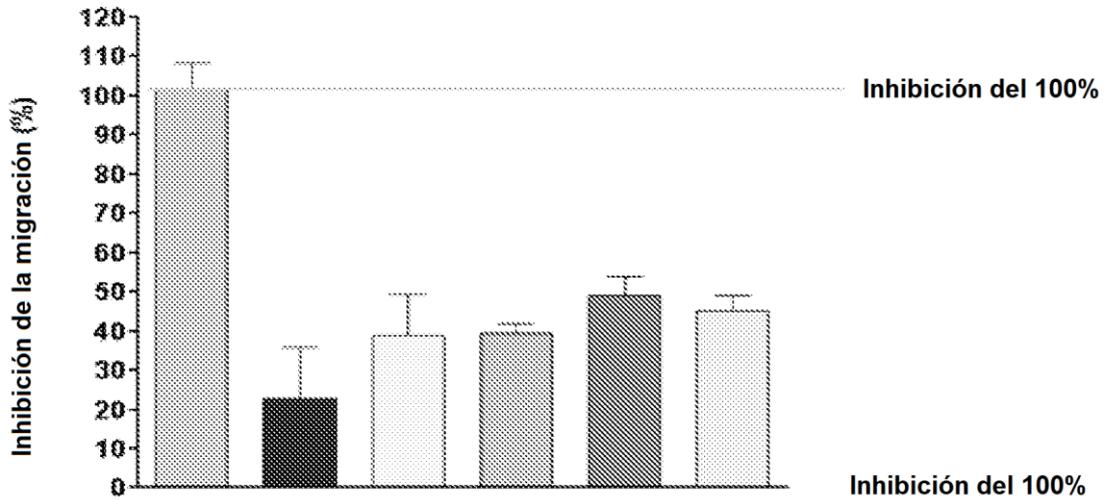
Fig. 3

A



| | | | | | | | | | | | | |
|---------------|---------|----|----|----|----|----|------|-----|----|----|----|----|
| VEGF (ng/ml): | Control | -- | -- | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| S100A4 (µM): | -- | 1 | -- | -- | -- | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 5C3 (µM): | -- | -- | -- | 4 | -- | -- | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | -- |
| 5H4 (µM): | -- | -- | -- | -- | 4 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | 4 |

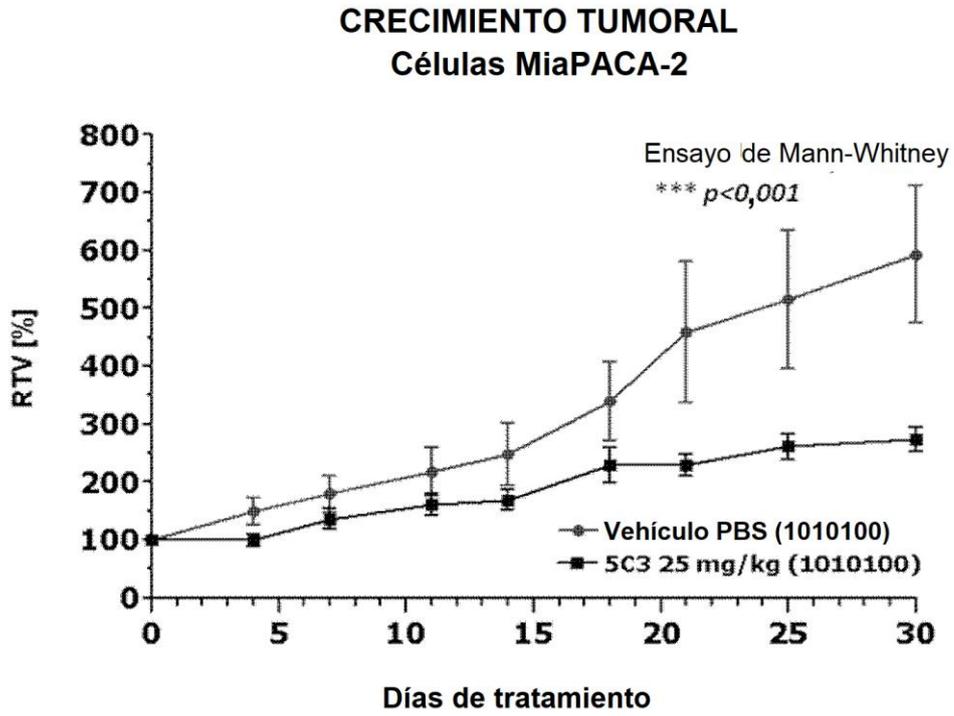
B



| | | | | | | |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| VEGF (ng/ml) | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| S100A4 (µM) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 6B9 (µM) | --- | 2 | --- | --- | --- | --- |
| 1E2 (µM) | --- | --- | 2 | --- | --- | --- |
| 8B6 (µM) | --- | --- | --- | 2 | --- | --- |
| 5C3 (µM) | --- | --- | --- | --- | 2 | --- |
| 5A3 (µM) | --- | --- | --- | --- | --- | 2 |

Fig. 4

A



B

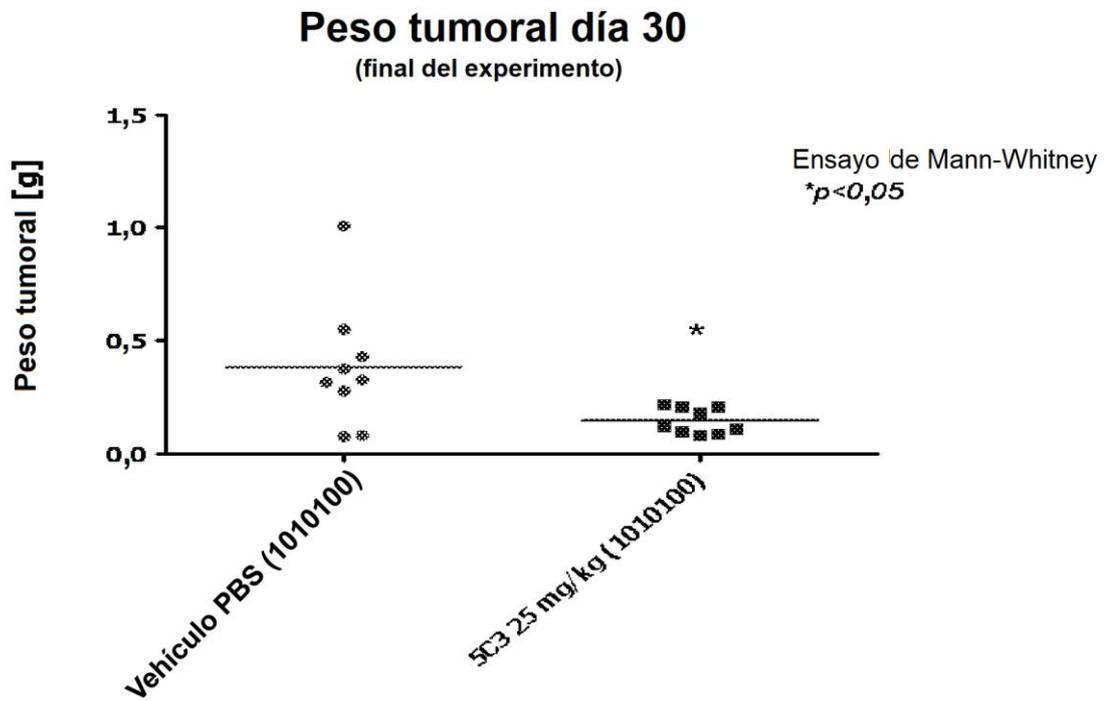


Fig. 5

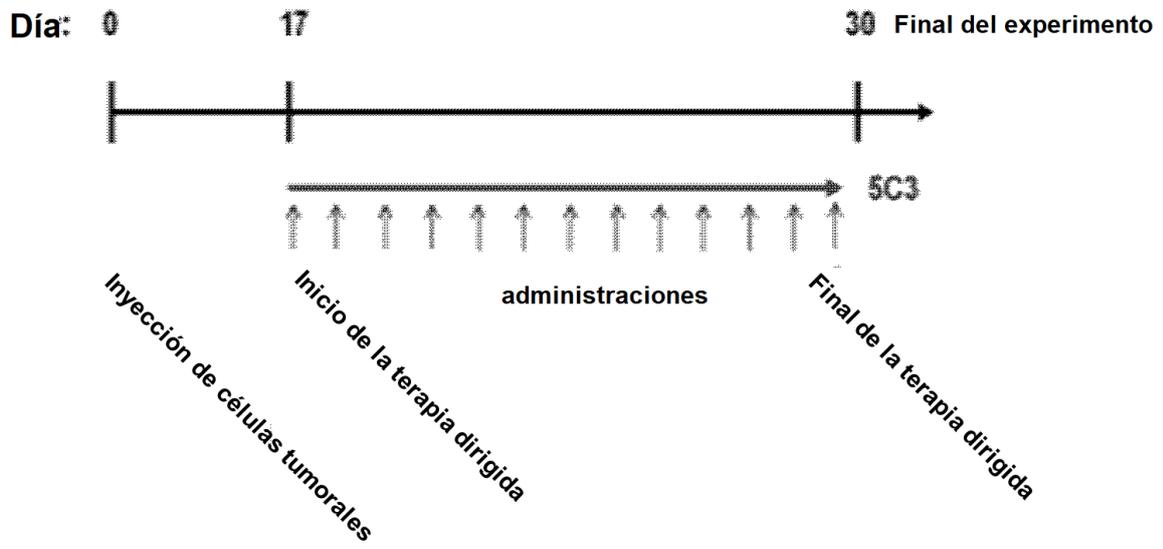
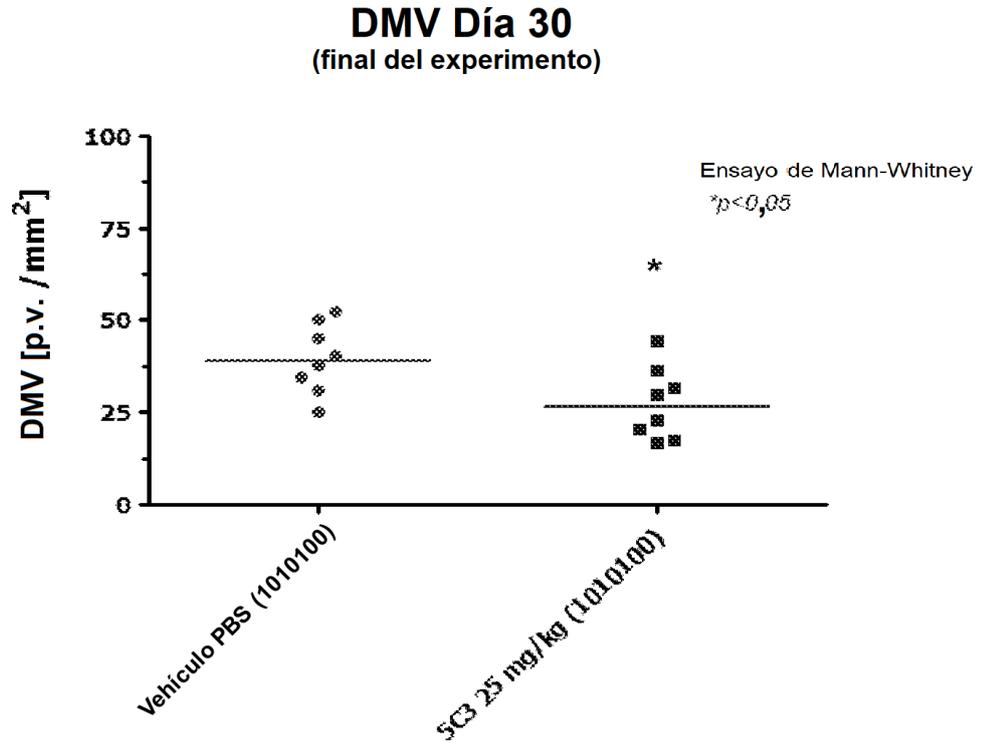


Fig. 6

A



B

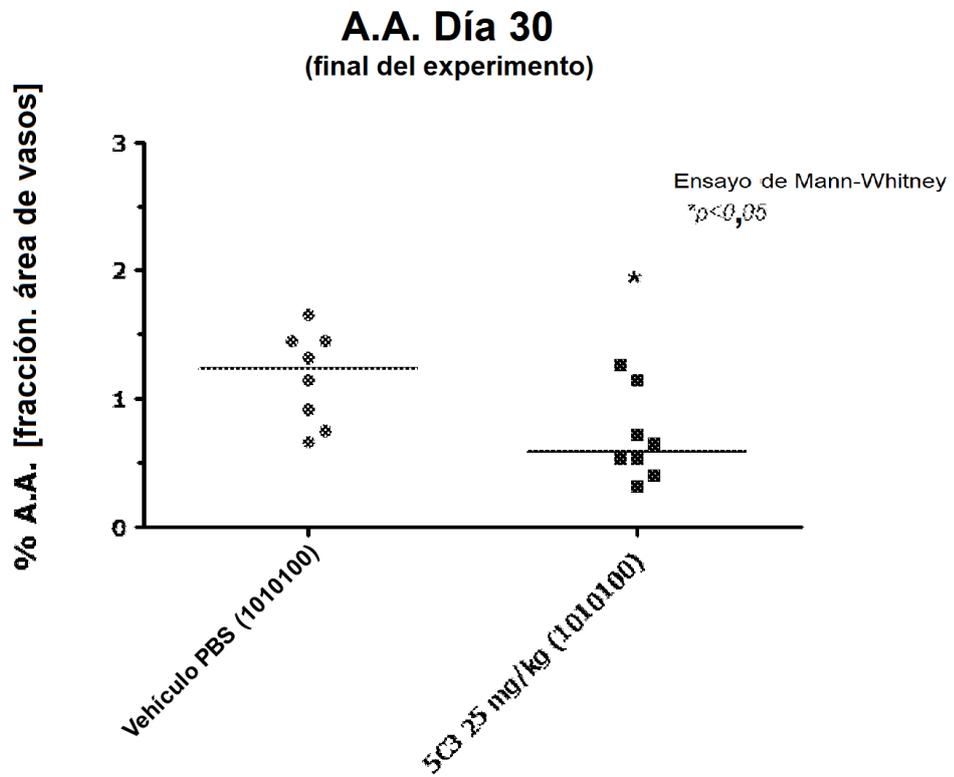
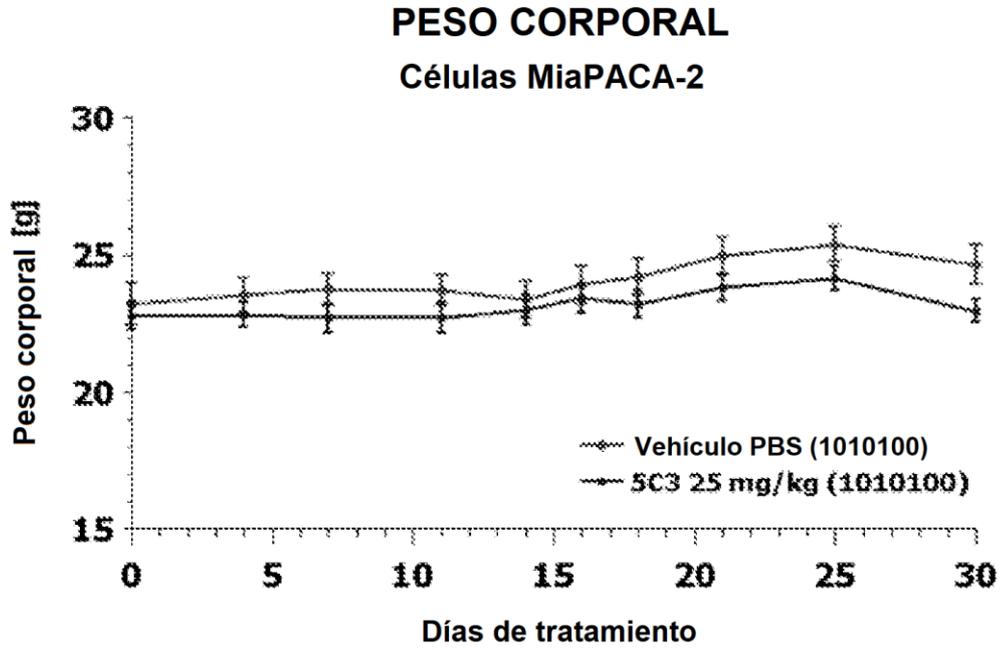


Fig. 7

A



B

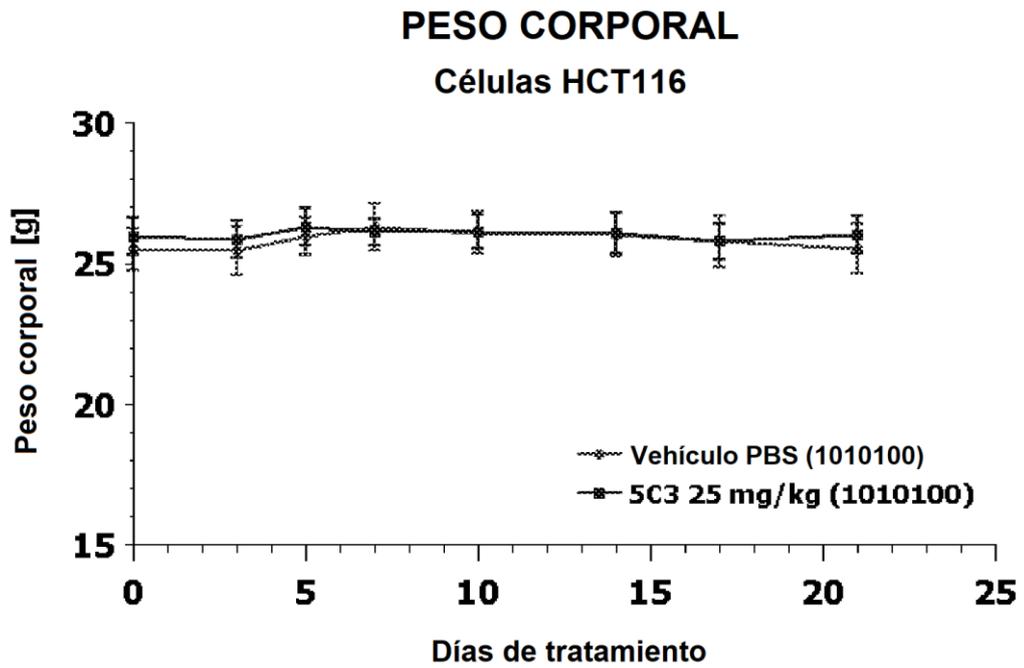


Fig. 8

Niveles plasmáticos

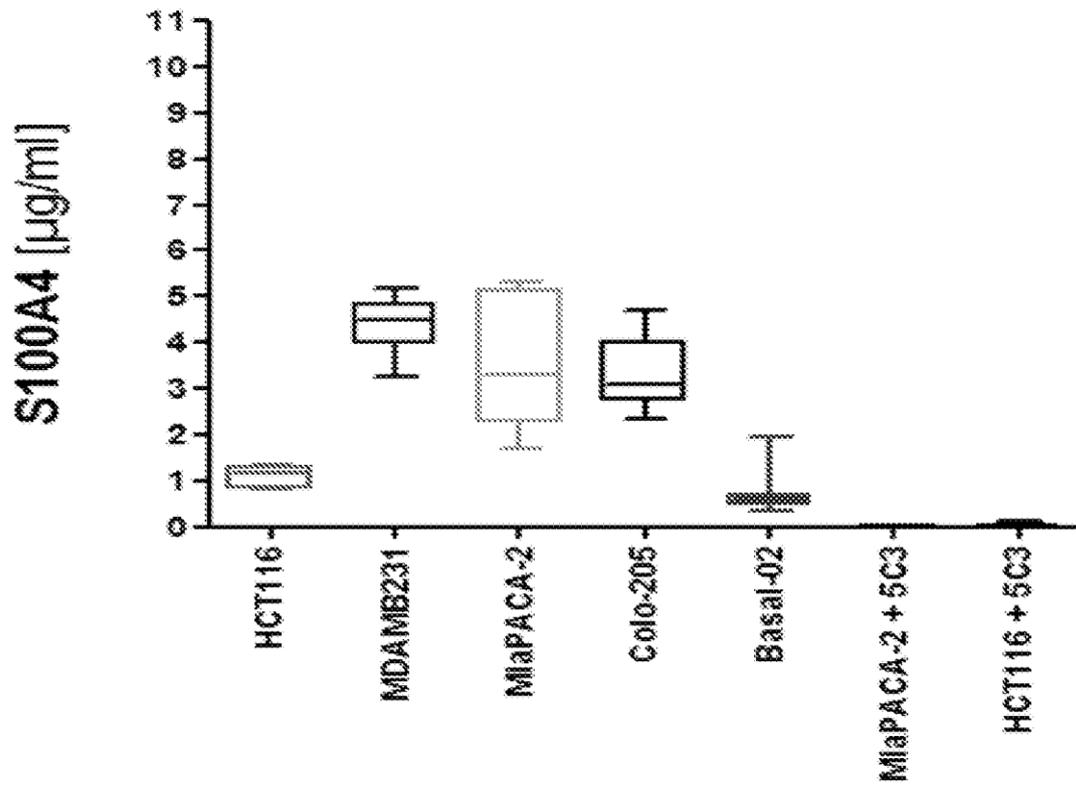


Fig. 9

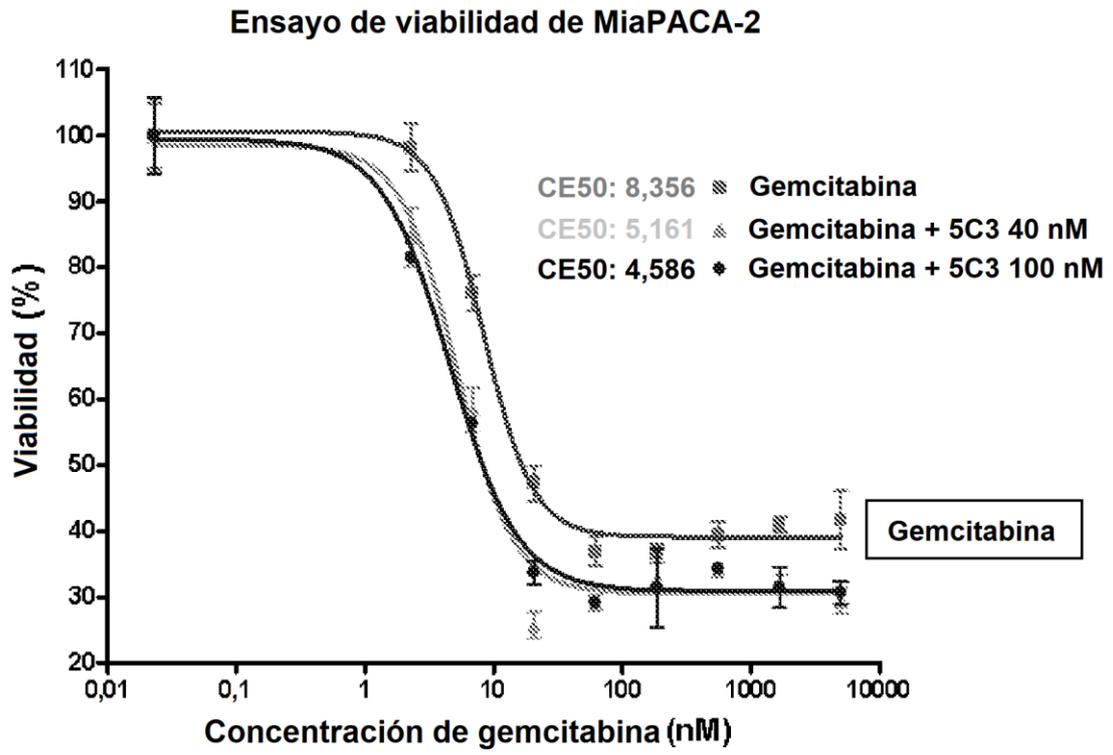


Fig. 10

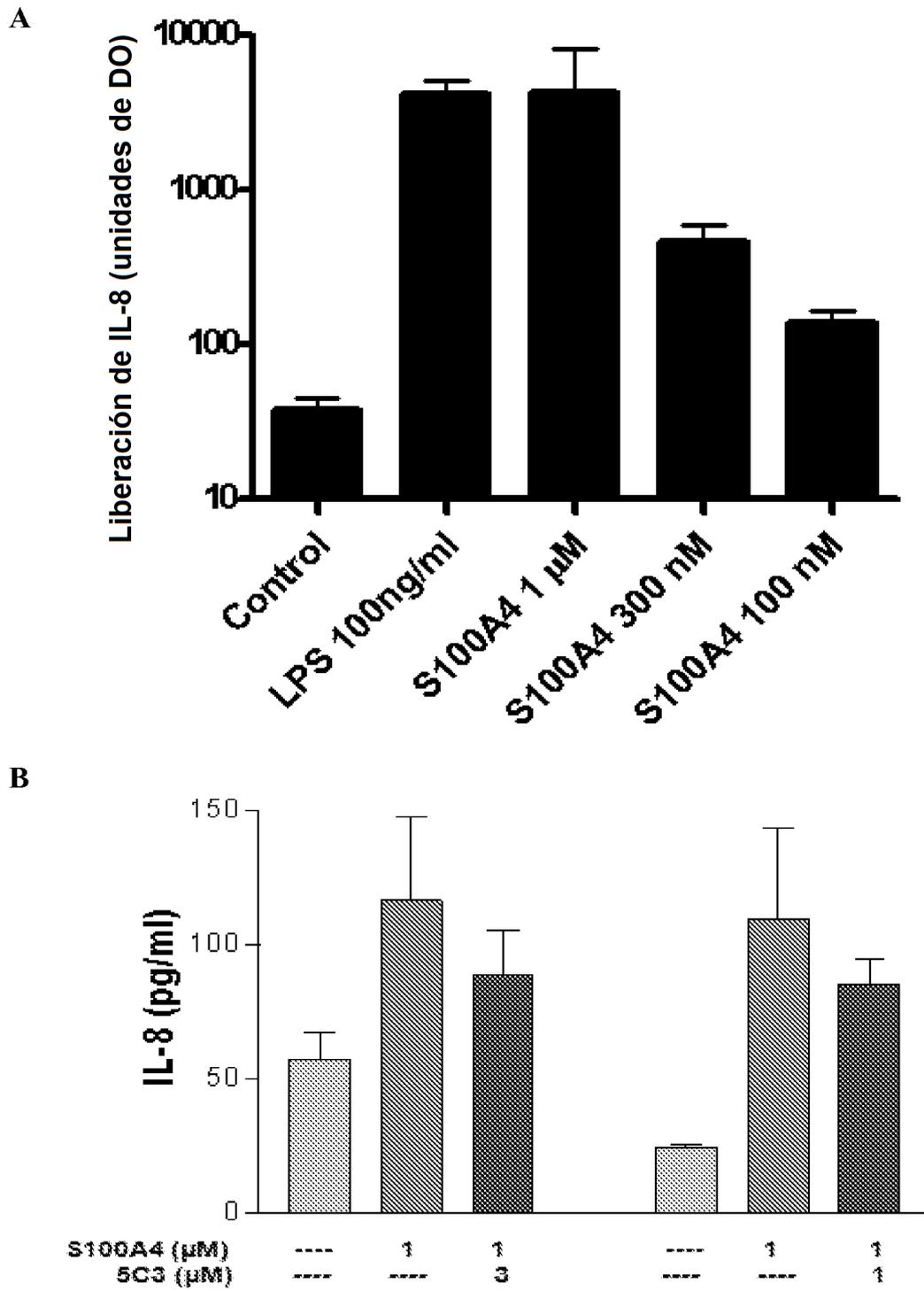


Fig. 11