

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 729**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2012** E 12003552 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019** EP 2662386

54 Título: **Anticuerpos que se unen a PLAC1 y bloquean la interacción entre PLAC1 y FGF7**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2019

73 Titular/es:

ASTELLAS PHARMA INC. (50.0%)
5-1, Nihonbashi-Honcho 2-Chome
Chuo-kuTokyo 103-8411, JP y
TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES
GUTENBERG- UNIVERSITÄT MAINZ
GEMEINNÜTZIGE GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

SAHIN, UGUR;
KOSLOWSKI, MICHAEL;
GRIMMLER, MATTHIAS;
BAREA ROLDÀN, DIANA;
HARTMANN, CHRISTOPH y
HUBICH, STEFANIE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 729 729 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 que se unen a PLAC1 y bloquean la interacción entre PLAC1 y FGF7

- 5 Las terapias contra el cáncer basada en anticuerpos se han introducido con éxito en la clínica y se han convertido en los productos terapéuticos más prometedores en la oncología durante la última década. Las terapias basadas en anticuerpos para el cáncer tienen el potencial de una mayor especificidad y un perfil de efectos secundarios inferior en comparación con los fármacos convencionales.
- 10 Las dianas de las terapias basadas en anticuerpos son, en particular, estructuras moleculares que se expresan o sobreexpresan exclusivamente en células tumorales. Además, si una estructura molecular está involucrada funcionalmente en el desarrollo del cáncer, la unión de anticuerpos a esta estructura puede antagonizar su función, lo que resulta en un efecto terapéuticamente beneficioso.
- 15 PLAC1 es un gen específico de la placenta que con frecuencia se activa de manera aberrante y tiene un alto nivel de expresión en una variedad de tipos de tumores. PLAC1 se localiza en la superficie de las células cancerosas y es accesible a los anticuerpos. En el caso del cáncer de mama, PLAC1 se expresa en el 82 % de los pacientes. En el caso del cáncer de pulmón y el cáncer gástrico, PLAC1 se expresa en 42 y 58 % de los casos, respectivamente.
- 20 Massabba E. y otros (2005) Mol. Reprod. Dev. 71: 299-304 describen que la expresión de PLAC1 se regula positivamente durante la diferenciación del trofoblasto, que se localiza principalmente en el sincitiotrofoblasto diferenciado y que la expresión de PLAC1 está regulada específicamente por factores de crecimiento peptídicos relevantes para la diferenciación del trofoblasto.
- 25 El documento núm. WO 2012/007981 describe el uso de anticuerpos contra la proteína PLAC1 como biomarcadores de infertilidad, un kit de diagnóstico para la detección de la respuesta inmunitaria contra PLAC1 y el uso de la proteína PLAC1 en los campos terapéutico y anticonceptivo.
- 30 Se ha observado que PLAC1 interactúa con FGF7 y que PLAC1, FGF7 y FGFR2IIIb pueden formar un complejo trimérico. Además, se ha observado que PLAC1 actúa como cofactor para la fosforilación específica de FGFR2IIIb mediada por FGF7, lo que potencia la proliferación y la migración de las células.

Resumen de la invención

- 35 La presente invención generalmente proporciona anticuerpos y mezclas de anticuerpos útiles como productos terapéuticos para tratar y/o prevenir enfermedades cancerosas, en particular, enfermedades cancerosas asociadas con células que expresan PLAC1 y/o que se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular. Tales enfermedades cancerosas incluyen cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides y las formas metastásicas de estos.

- 45 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal o una mezcla de anticuerpos monoclonales que se une al extremo C-terminal de PLAC1, preferentemente a la secuencia de aminoácidos que abarca desde los aminoácidos 23 al 212 de PLAC1 y bloquea la interacción entre PLAC1 y FGF7 para usar en un método para tratar el cáncer o para usar en un método para tratar las metástasis del cáncer, en donde PLAC1 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. El anticuerpo o la mezcla de anticuerpos se unen a PLAC1. En una modalidad, el anticuerpo o la mezcla de anticuerpos son capaces de inmunoprecipitar PLAC1. El anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal. En la presente descripción también se describe una mezcla de anticuerpos que es un anticuerpo policlonal. En una modalidad, la mezcla de anticuerpos de la invención es una mezcla de dos o más anticuerpos monoclonales. En una modalidad, la mezcla de anticuerpos de la invención comprende dos o más anticuerpos, cada uno de esos dos o más anticuerpos se unen a diferentes epítopos de PLAC1. En una modalidad, la mezcla de anticuerpos de la invención comprende uno o más anticuerpos que se unen a PLAC1 y (i) uno o más anticuerpos que se unen a FGF7 y/o (ii) uno o más anticuerpos que se unen a FGFR2IIIb. En una modalidad, el anticuerpo o la mezcla de anticuerpos de la invención inhibe la fosforilación de FGFR2IIIb dependiente de FGF7 y/o la fosforilación de Akt dependiente de FGF7/FGFR2IIIb. Preferentemente, la fosforilación de Akt tiene lugar en Thr308 y/o Ser473. En una modalidad, el anticuerpo o la mezcla de anticuerpos de la invención inhiben la proliferación, la migración y/o la adhesión de células cancerosas, preferentemente de células cancerosas que expresan PLAC1. En una modalidad, la proliferación, migración y/o adhesión de células cancerosas es dependiente de FGF7/FGFR2IIIb.

- 60 Los anticuerpos y las mezclas de anticuerpos descritas en la presente descripción preferentemente bloquean la interacción entre PLAC1 y FGF7 al unirse a un epítipo presente en PLAC1, con mayor preferencia al unirse a un epítipo presente en PLAC1 que está involucrado en la interacción con FGF7.

65

Preferentemente, el bloqueo de la interacción entre PLAC1 y FGF7 da como resultado la inhibición de la proliferación, la migración y/o la adhesión de las células, en particular de las células que expresan PLAC1 y/o se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular, tales como células cancerosas. Tal inhibición de la proliferación, migración y/o la adhesión de las células se induce preferentemente mediante la unión del anticuerpo o la mezcla de anticuerpos al PLAC1 que expresan dichas células y/o se asocia con la superficie celular de dichas células y puede utilizarse terapéuticamente como se describe en la presente descripción. En particular, la inhibición de la proliferación de células puede utilizarse para tratar o prevenir el cáncer. La inhibición de la proliferación, migración y/o la adhesión de las células puede utilizarse, en particular, para tratar o prevenir la metástasis del cáncer y la diseminación metastásica de las células cancerosas.

En una modalidad, los anticuerpos y las mezclas de anticuerpos descritas en la presente descripción inhiben la proliferación, la migración y/o la adhesión de células que expresan PLAC1 y/o se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular. Preferentemente, los anticuerpos y las mezclas de anticuerpos descritos en la presente descripción no inhiben la proliferación, la migración y/o la adhesión de las células que no expresan PLAC1 y/o no se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular.

De acuerdo con la invención, las células mencionadas en la presente descripción tales como las células que expresan PLAC1 y/o que se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular son preferentemente células cancerosas y en particular se seleccionan del grupo que consiste en células cancerosas tumorigénicas de las siguientes enfermedades cancerosas: cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de estos.

En una modalidad particularmente preferida, los anticuerpos o las mezclas de anticuerpos descritas en la presente descripción tienen la actividad de inhibir la proliferación de células tales como las células que expresan PLAC1 y/o que se caracterizan por asociación de PLAC1 con su superficie celular, preferentemente células cancerosas. Esta actividad puede medirse in vitro mediante la determinación de la proliferación de células en un ensayo con bromodeoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina, BrdU). BrdU es un nucleósido sintético que es un análogo de la timidina y puede incorporarse en el ADN recién sintetizado de las células en replicación (durante la fase S del ciclo celular), mediante la sustitución de la timidina durante la replicación del ADN. La detección del químico incorporado mediante el uso, por ejemplo, de anticuerpos específicos para BrdU indica que las células estuvieron activamente replicando su ADN. Las líneas celulares BT-549, Caov-3, EFO-21, SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 pueden usarse como células cancerosas que expresan PLAC1.

El bloqueo de la interacción entre PLAC1 y FGF7 mediante la unión de un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos de la invención al antígeno PLAC1 puede inhibir la proliferación de células tales como las células que expresan PLAC1 y/o se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular (por ejemplo, células cancerosas). Alternativamente o además de inhibir la proliferación de células, la unión de un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos de la invención al antígeno PLAC1 puede inhibir la migración y/o la adhesión de células tales como las células que expresan PLAC1 y/o se caracterizan por asociación de PLAC1 con su superficie celular (por ejemplo, las células cancerosas), y por lo tanto, pueden inhibir la propagación metastásica de las células cancerosas.

De acuerdo con todos los aspectos de la invención, PLAC1 es preferentemente PLAC1 humano, que tiene preferentemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, con mayor preferencia tiene la secuencia de aminoácidos que abarca desde los aminoácidos 23 al 212 de la SEQ ID NO: 1.

Los anticuerpos o mezclas de anticuerpos descritos en la presente descripción pueden obtenerse mediante un método que comprende la etapa de inmunizar a un animal con una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o un fragmento inmunogénico de la misma, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicha proteína o fragmento inmunogénico.

Preferentemente, los anticuerpos o las mezclas de anticuerpos descritos en la presente descripción son específicos para PLAC1.

En una modalidad, los anticuerpos descritos en la presente descripción, tales como los anticuerpos de la invención o los anticuerpos comprendidos en una mezcla de anticuerpos de la invención, están vinculados funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro tipo) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), un ligando celular o un resto terapéutico tal como una toxina, un radioisótopo, un fármaco tal como un fármaco anticanceroso de molécula pequeña, una citoquina recombinante o quimioquina o un agente citotóxico. Por consiguiente, la presente invención abarca una gran variedad de conjugados de anticuerpos, moléculas biespecíficas y multiespecíficas, y proteínas de fusión. Generalmente, para los propósitos de la presente invención, el término "anticuerpo" abarca todos los derivados de anticuerpos tales como conjugados de anticuerpos, moléculas biespecíficas y multiespecíficas y proteínas de fusión descritos en la presente descripción.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden derivarse de diferentes especies, que incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata, conejo, cobayo y humano.

5 Los anticuerpos descritos en la presente descripción también incluyen moléculas quiméricas en las que una región constante del anticuerpo derivado de una especie, preferentemente humana, se combina con el sitio de unión a antígeno derivado de otra especie. Además, los anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen moléculas humanizadas en las que los sitios de unión al antígeno de un anticuerpo derivado de una especie no humana se combinan con las regiones constantes y regiones marco de origen humano.

10 Los anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales e incluyen IgA tales como anticuerpos IgA1 o IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM, e IgD. En varias modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, más particularmente un IgG1, isotipo kappa o IgG1 isotipo lambda (es decir, IgG1, κ , λ), un anticuerpo IgG2a (por ejemplo IgG2a, κ , λ), un anticuerpo IgG2b (por ejemplo IgG2b, κ , λ), un anticuerpo IgG3 (por ejemplo IgG3, κ , λ) o un anticuerpo IgG4 (por ejemplo IgG4, κ , λ). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos o sus fragmentos de unión a antígeno de estos que incluyen, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, fragmentos Fv de cadena sencilla o anticuerpos biespecíficos. Además, los fragmentos de unión a antígeno incluyen las proteínas de fusión al dominio de unión de la inmunoglobulina que comprenden (i) un dominio de unión del polipéptido (tal como una región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena ligera) que se fusiona a un polipéptido de la región de bisagra de la inmunoglobulina (ii) una región constante CH2 de la cadena pesada de la inmunoglobulina que se fusiona a la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de la cadena pesada de la inmunoglobulina que se fusiona a la región constante CH2. Tales proteínas de fusión al dominio de unión de la inmunoglobulina se describen adicionalmente en los documentos núms.US2003/0118592y US 2003/0133939. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados.

20 En modalidades preferidas, los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden caracterizarse por una o más de las siguientes propiedades:

- 25 a) especificidad para PLAC1;
 b) una afinidad de unión a PLAC1 de aproximadamente 100 nM o menos, preferentemente aproximadamente 5-10 nM o menos y, con mayor preferencia, de aproximadamente 1-3 nM o menos;
 30 c) la capacidad de inhibir el crecimiento de células tales como las células que expresan PLAC1 y/o las células que se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular;
 d) la capacidad de inhibir la migración de células tales como las células que expresan PLAC1 y/o las células que se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular;
 35 e) la capacidad de inhibir la adhesión de células tales como las células que expresan PLAC1 y/o las células que se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas/kits, que comprenden un anticuerpo monoclonal o una mezcla de anticuerpos monoclonales que se une al extremo C-terminal de PLAC1, preferentemente a la secuencia de aminoácidos que abarca desde los aminoácidos 23 al 212 de PLAC1 y bloquea la interacción entre PLAC1 y FGF7 para usar en un método para tratar el cáncer o para usar en el tratamiento de la metástasis del cáncer, en donde PLAC1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Una composición farmacéutica de la invención puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable y opcionalmente, puede comprender uno o más adyuvantes, estabilizantes, etc.

45 Una composición farmacéutica de la invención es para usar en un método para tratar el cáncer o para usar en un método para tratar la metástasis del cáncer. En una modalidad, las células cancerosas expresan PLAC1.

Los anticuerpos, las mezclas de anticuerpos y las composiciones descritas en la presente descripción pueden usarse para tratar y/o prevenir una variedad de enfermedades, preferentemente enfermedades que involucran células que expresan PLAC1 y/o se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular mediante la administración de los anticuerpos, las mezclas de anticuerpos y las composiciones a pacientes que padecen tales enfermedades.

En este aspecto, la presente descripción describe métodos para el tratamiento o la prevención de enfermedades, en particular enfermedades cancerosas, al bloquear la interacción entre PLAC1 y FGF7, en particular a través de la orientación a PLAC1 tal como el PLAC1 que expresan las células y/o el que se asocia a las superficies de las células, tales como las células cancerosas. Las enfermedades preferidas para un tratamiento o prevención son aquellas en las que están involucradas las células que expresan PLAC1 y/o que se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular, tales como enfermedades cancerosas, en particular enfermedades cancerosas como se describe en la presente descripción.

60 Específicamente, los anticuerpos, las mezclas de anticuerpos y las composiciones descritas en la presente descripción pueden usarse en una variedad de métodos para inhibir el crecimiento de células tales como las células que expresan PLAC1 y/o las que se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular y/o inhiben la propagación metastásica de células tales como las células que expresan PLAC1 y/o se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular mediante el contacto de las células con una cantidad efectiva de anticuerpos, mezclas de anticuerpos y composiciones, de manera que se inhibe el crecimiento de las células y/o la diseminación metastásica de las células.

Las células que expresan PLAC1 y/o se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular incluyen células cancerosas.

5 Las enfermedades ilustrativas que pueden tratarse (por ejemplo, mejorarse) o prevenirse de acuerdo con la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, las enfermedades cancerosas. Ejemplos de enfermedades cancerosas, que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides y las formas metastásicas de estos.

15 Por consiguiente, la presente descripción describe un método para tratar el cáncer que comprende la etapa de administrar el anticuerpo o la mezcla de anticuerpos de la invención. Además, la presente descripción describe un método para tratar las metástasis del cáncer que comprende la etapa de administrar el anticuerpo o la mezcla de anticuerpos de la invención. En una modalidad, las células cancerosas expresan PLAC1.

20 La presente invención proporciona los anticuerpos, las mezclas de anticuerpos y las composiciones descritas en la presente descripción para usar en un método para tratar el cáncer o para usar en un método para tratar las metástasis del cáncer.

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1: Mezclas distintas de anticuerpos contra PLAC1 que reconocen diferentes epítomos pueden unirse y precipitar PLAC1 nativo mucho mejor que otras mezclas.

30 Figura 2: Los anticuerpos monoclonales específicos de PLAC1 bloquean la unión de PLAC1 a FGF7 en un ensayo de interacción in vitro mediante el uso de FGF7 recombinante y PLAC1 sobreexpresado.

Figura 3: Ensayo de coimmunoprecipitación que demuestra que PLAC1 interactúa específicamente con FGF7 y forma un complejo con el receptor FGFR2IIIb in vivo.

35 Figura 4: Se analizó y se caracterizó el mecanismo de acción de PLAC1 mediante el uso de análisis de microarreglos y transferencias Western. La proliferación celular se controla mediante la fosforilación dependiente de FGFR2IIIb y la activación de Akt en células de coriocarcinoma BeWo.

Figura 5: La estimulación de Akt dependiente de FGF7 está influenciada por PLAC1 en células MCF7.

40 Figura 6: PLAC1 es necesario para la proliferación mediada por FGF7/FGFR2IIIb en la línea celular de cáncer de mama MCF7.

Figura 7: PLAC1 es necesario para la proliferación mediada por FGF7 en la línea celular de coriocarcinoma BeWo.

45 Figura 8: hPLAC1 promueve la adhesión de la línea celular de coriocarcinoma BeWo a las superficies del cultivo celular.

Figura 9: PLAC1 es necesario para la adhesión de células HEK a las superficies.

Definición de los términos

50 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente descripción tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica.

A continuación, se describirán los elementos de la presente invención.

55 Preferentemente, los términos que se usan en la presente descripción se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, y H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Suiza, (1995).

60 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura del campo (consultar, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da Edición, J. Sambrook y otros eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

65 A lo largo de esta descripción y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión

de un miembro declarado, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas pero no la exclusión de ningún otro miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas aunque en algunas modalidades tal otro miembro entero, o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas pueden excluirse, es decir, el tema consiste en la inclusión de un miembro declarado, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas. Los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares usados en el contexto para describir la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) se deben interpretar para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de cualquier otra forma en la presente descripción o claramente se contradiga por el contexto. La enumeración de los intervalos de valores en la presente descripción pretende servir simplemente como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique de otra manera en la presente descripción, cada valor individual se incorpora en la descripción como si se enumerara individualmente en la presente descripción. Todos los métodos que se describen en la presente descripción pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra manera en la presente descripción o que el contexto lo contradiga claramente de otra manera. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") que se proporciona en la presente descripción simplemente tiene el propósito de ilustrar mejor la invención y no representa una limitación en el alcance de la invención que se reivindica de otra manera. El lenguaje en la descripción no deberá interpretarse como indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

El término "PLAC1" preferentemente se refiere a PLAC1 humana, y, en particular, a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

En una modalidad, el término "PLAC1" se refiere a la secuencia de aminoácidos de PLAC1 que no incluye el dominio hidrófobo N-terminal. El término "PLAC1" incluye una proteína que comprende los aminoácidos 29 al 119, preferentemente los aminoácidos 29 al 212 y con mayor preferencia los aminoácidos 23 al 212 de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes a una variante de SEQ ID NO: 1.

FGF7 es un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Los miembros de la familia FGF poseen amplias actividades mitogénicas y de supervivencia celular, y están involucrados en una variedad de procesos biológicos, que incluyen el desarrollo embrionario, el crecimiento celular, la morfogénesis, la reparación de tejidos, el crecimiento de tumores y la invasión.

El término "FGF7" preferentemente se refiere a FGF7 humano, y, en particular, a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

FGFR2 es un receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos. Los miembros de la familia FGFR difieren entre sí en las afinidades de sus ligandos y en la distribución tisular. Una proteína representativa de longitud completa consiste en una región extracelular, compuesta por tres dominios de inmunoglobulina, un único segmento hidrófobo que abarca la membrana y un dominio citoplásmico de tirosina quinasa. La porción extracelular de la proteína interactúa con los factores de crecimiento de los fibroblastos, que pone en movimiento una cascada de señales de regulación negativa, que en última instancia influyen en la mitogénesis y en la diferenciación. FGFR2 tiene dos isoformas naturales FGFR2IIIb y FGFR2IIIc, que se crean por empalme del tercer dominio de tipo inmunoglobulínico. FGFR2IIIb se une a FGF-1, -3, -7, -10, -22.

El término "FGFR2IIIb" preferentemente se refiere a FGFR2IIIb humano, y, en particular, a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

El término "variante" de acuerdo con la invención se refiere, en particular, a mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular aquellos que están presentes de manera natural. Una variante alélica se refiere a una alteración en la secuencia normal de un gen, cuya relevancia frecuentemente no está clara. La secuenciación génica completa a menudo identifica numerosas variantes alélicas para un gen determinado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácido nucleico o aminoácido con una especie de origen diferente de una secuencia determinada de un ácido nucleico o aminoácido.

El término "variante" abarcará cualquiera de las variantes modificadas postraduccionalmente y variantes conformacionales.

"Superficie celular" se usa de acuerdo con su significado normal en la técnica, y por lo tanto, incluye el exterior de la célula que es accesible a la unión por proteínas y otras moléculas.

PLAC1 se asocia con la superficie de las células si se localiza en la superficie de dichas células y es accesible para la unión con los anticuerpos específicos de PLAC1 que se añaden a la célula. En modalidades preferidas, una célula que se caracteriza por la asociación de PLAC1 con su superficie celular es una célula que expresa PLAC1. Debe entenderse que en el caso en que las células expresen PLAC1, el PLAC1 asociado con la superficie de dichas células puede ser solo una parte del PLAC1 expresado, en particular una parte del mismo como se definió anteriormente.

De acuerdo con la invención, el PLAC1 no se expresa sustancialmente en una célula y/o no se asocia sustancialmente con una superficie celular si el nivel de expresión y/o de asociación es inferior en comparación con la expresión y/o la asociación en las células de la placenta o en el tejido de la placenta. Preferentemente, el nivel de expresión y/o de asociación es inferior al 10 %, preferentemente, inferior al 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0.5 %, 0.1 % o 0.05 % o incluso inferior de la expresión y/o de la asociación en las células de la placenta o tejido placentario. Preferentemente, PLAC1 no se expresa sustancialmente en una célula y/o no se asocia sustancialmente con una superficie celular si el nivel de expresión y/o de asociación excede el nivel de expresión y/o de asociación en tejido no canceroso distinto de la placenta tal como tejido no canceroso de uno o más de cerebro, pulmón, mama, colon, hígado, riñón, próstata, páncreas, ovario, bazo, piel, miocardio y endometrio por no más de 2 veces, preferentemente 1,5 veces, y preferentemente no excede el nivel de expresión y/o de asociación en dicho (s) tejido (s) no cancerosos. Preferentemente, PLAC1 no se expresa sustancialmente en una célula y/o no se asocia sustancialmente con una superficie celular si el nivel de expresión o de asociación está por debajo del límite de detección y/o si el nivel de expresión o de asociación es demasiado bajo para permitir la unión por los anticuerpos específicos de PLAC1 que se añaden a las células.

De acuerdo con la invención, PLAC1 se expresa en una célula y/o se asocia con una superficie celular si el nivel de expresión y/o de asociación excede el nivel de expresión y/o de asociación en tejido no canceroso distinto de la placenta tal como tejido no canceroso de uno o más de cerebro, pulmón, mama, colon, hígado, estómago, riñón, próstata, páncreas, ovario, bazo, piel, miocardio y endometrio, preferentemente en más de 2 veces, preferentemente 10 veces, 100 veces, 1000 veces, o 10000 veces. Preferentemente, PLAC1 se expresa en una célula y/o se asocia con una superficie celular si el nivel de expresión o de asociación está por encima del límite de detección y/o si el nivel de expresión o de asociación es suficientemente alto como para permitir la unión con los anticuerpos específicos PLAC1 que se añaden a las células. Preferentemente, el PLAC1 que se expresa en una célula se expresa o expone en la superficie de dicha célula.

De acuerdo con la invención, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, con la inclusión de cáncer, en particular, las formas de cáncer que se describen en la presente descripción.

"Enfermedades que se asocian con células que expresan PLAC1 y/o que se caracterizan por asociación de PLAC1 con su superficie celular" significa de acuerdo con la invención que la expresión y/o la asociación en las células de un tejido u órgano enfermo preferentemente aumenta en comparación con el estado en un tejido u órgano sano. Un aumento se refiere a un aumento de al menos 10 %, en particular al menos 20 %, al menos 50 %, al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 500 %, al menos 1000 %, al menos 10000 % o aún más. En una modalidad, la expresión y/o la asociación con la superficie celular solo se encuentran en un tejido enfermo, mientras que la expresión y/o la asociación con la superficie celular en un tejido sano se reprime. De acuerdo con la invención, las enfermedades que se asocian con las células que expresan PLAC1 y/o que se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular incluyen las enfermedades cancerosas. Además, de acuerdo con la invención, las enfermedades cancerosas son preferentemente aquellas en donde las células cancerosas expresan PLAC1 y/o se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular.

Como se usa en la presente descripción, una "enfermedad cancerosa" o "cáncer" incluye una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento, proliferación, diferenciación, adhesión y/o migración celular regulados aberrantemente. Por "célula cancerosa" se entiende una célula anormal que crece por una proliferación celular rápida y descontrolada y continúa creciendo después de que cesa el estímulo que inició el nuevo crecimiento. Preferentemente, una "enfermedad cancerosa" se caracteriza por células que expresan PLAC1 y/o que se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular y una célula cancerosa expresa PLAC1 y/o se caracteriza por la asociación de PLAC1 con su superficie celular. Una célula que expresa PLAC1 y/o que se caracteriza por la asociación de PLAC1 con su superficie celular es, preferentemente, una célula cancerosa, preferentemente de los cánceres que se describen en la presente descripción. Preferentemente, tal célula es una célula distinta de una célula placentaria.

Las enfermedades cancerosas o los cánceres preferidos de acuerdo con la invención se seleccionan del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides y las formas metastásicas de estos.

De acuerdo con la invención, un "carcinoma" es un cáncer que comienza en la capa de revestimiento (células epiteliales) de los órganos.

El coriocarcinoma es un cáncer maligno, trofoblástico y agresivo, usualmente de la placenta. Se caracteriza por una diseminación hematogena temprana a los pulmones.

Un sarcoma es un cáncer del tejido conectivo (hueso, cartilago, grasa) que resulta en la proliferación del mesodermo. Esto está en contraste con los carcinomas, que son de origen epitelial.

El carcinoma de células renales, conocido también como cáncer de células renales o adenocarcinoma de células renales es un cáncer de riñón que se origina en el revestimiento del túbulo contorneado proximal, los tubos muy pequeños en el riñón que filtran la sangre y eliminan los productos de desecho. El carcinoma de células renales es, con mucho, el tipo más común de cáncer de riñón en adultos y el más letal de todos los tumores genitourinarios. Los distintos subtipos de

carcinoma de células renales son el carcinoma de células renales de células claras y el carcinoma de células renales papilares. El carcinoma de células renales de células claras es la forma más común del carcinoma de células renales. Cuando se observan bajo un microscopio, las células que componen el carcinoma de células renales de células claras aparecen muy pálidas o claras. El carcinoma de células renales papilares es el segundo subtipo más común. Estos cánceres forman pequeñas proyecciones en forma de dedos (denominadas papilas) en algunos, si no en la mayoría, de los tumores.

Por "metástasis" se entiende la propagación de las células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de las células malignas del tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración de las membranas basales del endotelio para entrar en la cavidad y en los vasos del cuerpo, y después, tras haberse transportado por la sangre, la infiltración en los órganos dianas. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio diana depende de la angiogénesis. A menudo la metástasis del tumor ocurre incluso después de la remoción del tumor primario porque las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar un potencial metastásico. En una modalidad, el término "metástasis" de acuerdo con la invención se refiere a la "metástasis a distancia" que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y del sistema de ganglios linfáticos regionales.

Las células de un tumor secundario o metastásico son como las del tumor original. Esto significa, por ejemplo, que si el cáncer de ovario hace metástasis en el hígado, el tumor secundario se forma por células ováricas anormales, no por células hepáticas anormales. El tumor en el hígado entonces se denomina cáncer de ovario metastásico, no cáncer de hígado.

En una modalidad, un cáncer de acuerdo con la invención es cáncer de mama metastásico, preferentemente cáncer de mama metastásico en el pulmón.

Por "tratar" se entiende administrar un compuesto o composición a un sujeto con el fin de prevenir o eliminar una enfermedad, que incluye reducir el tamaño de un tumor o el número de tumores en un sujeto; detener o retrasar una enfermedad en un sujeto; inhibir o retrasar el desarrollo de una nueva enfermedad en un sujeto; disminuir la frecuencia o la gravedad de los síntomas y/o de las recurrencias en un sujeto que actualmente tiene o que ha tenido una enfermedad con anterioridad; y/o prolongar, es decir, aumentar la duración de la vida del sujeto.

En particular, el término "tratamiento de una enfermedad" incluye curar, acortar la duración, mejorar, prevenir, retrasar o inhibir la progresión o el empeoramiento, o prevenir o demorar la aparición de una enfermedad o los síntomas de esta.

El término "paciente" significa de acuerdo con la invención un ser humano, un primate no humano u otro animal, en particular un mamífero tal como una vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o un roedor tal como un ratón y una rata. En una modalidad particularmente preferida, el paciente es un ser humano.

El término "antígeno" se refiere a un agente tal como una proteína o péptido que comprende un epítipo contra el cual se direcciona y/o es para direccionar una respuesta inmunitaria. En una modalidad que se prefiere, un antígeno es un antígeno asociado a un tumor, tal como PLAC1, es decir, un constituyente de células cancerosas que pueden derivarse del citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular, en particular aquellos antígenos que se producen, preferentemente en gran cantidad, intracelular o como antígenos de superficie en células cancerosas.

En el contexto de la presente invención, el término "antígeno asociado a tumor" preferentemente se refiere a proteínas que en condiciones normales se expresan específicamente en un número limitado de tejidos y/u órganos o en etapas específicas del desarrollo, por ejemplo, el antígeno asociado a tumor en condiciones normales puede expresarse específicamente en órganos reproductores, por ejemplo, en testículos, en tejido trofoblástico, por ejemplo, en la placenta, o en células de la línea germinal y se expresan o se expresan de manera aberrante en uno o más tejidos tumorales o cancerosos. Los antígenos asociados a tumores en el contexto de la presente invención incluyen, por ejemplo, antígenos de diferenciación, preferentemente, antígenos de diferenciación de tipo celular específico, es decir, proteínas que en condiciones normales se expresan específicamente en un cierto tipo de célula, en cierta etapa de diferenciación, antígenos de cáncer/testículos, es decir, proteínas que en condiciones normales se expresan específicamente en testículos y algunas veces en la placenta, y antígenos específicos de línea germinal. En el contexto de la presente invención, el antígeno asociado a tumor se asocia preferentemente con la superficie celular de una célula cancerosa y preferentemente, no se expresa o solo se expresa rara vez en tejidos normales.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico en una molécula, es decir, a la parte en una molécula que se reconoce por el sistema inmunitario, por ejemplo, que se reconoce por un anticuerpo. Por ejemplo, los epítipos son los sitios discretos, tridimensionales en un antígeno, que se reconocen por el sistema inmunitario. Los epítipos usualmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como los aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen usualmente características específicas de estructura tridimensional, así como también características específicas de carga. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. Un epítipo de una proteína tal como PLAC1 comprende preferentemente una porción continua o discontinua de dicha proteína y tiene, preferentemente, entre 5 y 100, preferentemente entre 5 y 50, con mayor preferencia entre 8 y 30, con la máxima preferencia entre 10 y 25

aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítipo puede tener, preferentemente, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.

El término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que se interconectan por enlaces disulfuro, e incluye cualquier molécula que comprende una porción de unión a antígeno de este. El término "anticuerpo" incluye los anticuerpos monoclonales y fragmentos o derivados de estos, que incluyen, sin limitación, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, scFv y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno tales como fragmentos Fab y Fab' e incluye, además, todas las formas recombinantes de los anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos que se expresan en procariontes, anticuerpos no glicosilados y cualquiera de los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno y derivados como se describen en la presente descripción. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino terminal al carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, que incluyen varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y al primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser anticuerpos humanos. El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, pretende incluir los anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos que se describen en la presente descripción pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, en donde la estructura remanente de la inmunoglobulina de la molécula se basa en la estructura y/o la secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender tanto dominios variables completos fusionados a dominios constantes como solo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) injertadas en las regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificados para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDR que se alteran con respecto al anticuerpo original.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en donde una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase particular, mientras que el segmento remanente de la cadena es homólogo a secuencias correspondientes en otro. Típicamente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada mimetiza las regiones variables de los anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra. Una clara ventaja de tales formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas mediante el uso de células B fácilmente disponibles o hibridomas de organismos huéspedes no humanos en combinación con las regiones constantes que se derivan de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Mientras que la región variable tiene la ventaja de ser fácil de preparar y que la fuente no afecta a la especificidad, la región constante que es humana, es menos probable que genere una respuesta inmunitaria de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que si la región constante fuera de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo particular.

Los términos "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de unión") o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "fragmento de unión") o términos similares, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede llevarse a cabo por los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, (iii) fragmentos Fd que consisten en los dominios VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward y otros, (1989) Nature 341: 544-546), que consisten en un dominio VH; (vi) regiones aisladas determinantes de la complementariedad (CDR), y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden estar opcionalmente unidas por un conector sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican por genes separados, ellos pueden unirse, mediante el uso de métodos recombinantes, por un conector sintético que les permite hacerlos como una proteína de cadena única en la que las

regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); ver por ejemplo, Bird y otros (1988) Science 242: 423-426; y Huston y otros (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena única se abarquen dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional son las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión que se fusiona a un polipéptido de la región bisagra de la inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de la cadena pesada de la inmunoglobulina que se fusiona a la región bisagra y (iii) una región constante CH3 de la cadena pesada de la inmunoglobulina que se fusiona a la región constante CH2. El polipéptido del dominio de unión puede ser una región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen además en los documentos núms. US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen mediante el uso de técnicas convencionales que conocen los expertos en la técnica, y se seleccionan los fragmentos para la utilidad de la misma manera que a los anticuerpos intactos.

El término "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido, o complejo de proteína o péptido, que tiene dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular, y (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora. El término "molécula multiespecífica" o "molécula heteroespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido, o complejo de proteína o péptido, que tiene más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular, (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora, y (c) al menos otro componente. En consecuencia, la invención incluye, pero no se limita a, moléculas biespecíficas, trispecíficas, tetraspecíficas y otras multiespecíficas que se dirigen a PLAC1, y a otras dianas, tales como receptores de Fc en las células efectoras. El término "anticuerpos biespecíficos" incluye, además, diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los cuales los dominios VH y VL se expresan en una cadena polipeptídica única, pero mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo cual fuerza, de ese modo, a que los dominios se aparean con dominios complementarios de otra cadena y crea dos sitios de unión al antígeno (ver, por ejemplo, Holliger, P., y otros, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., y otros, (1994) Structure 2: 1121-1123).

Un anticuerpo puede conjugarse a un resto o agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial a y, en particular, mate a las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y sus análogos u homólogos de estos. Los agentes terapéuticos adecuados para formar anticuerpos conjugados incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y platino cisdiclorodiamina (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). En una modalidad que se prefiere, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otra modalidad, el agente terapéutico es un inmunosupresor. En otra modalidad más, el agente terapéutico es GM-CSF. En una modalidad que se prefiere, el agente terapéutico es doxorubicina, cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A.

Los anticuerpos también pueden conjugarse a un radioisótopo, por ejemplo, yodo 131, itrio 90 o indio 111, para generar radiofármacos citotóxicos.

Los anticuerpos conjugados de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada y el resto del fármaco no debe interpretarse como limitada para agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o su fragmento activo, tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina 2 ("IL-2"), interleuquina 6 ("IL-6"), factor de estimulación de colonias de macrófagos granulocitos ("GM-CSF"), factor de estimulación de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar tales restos terapéuticos a anticuerpos se conocen bien, ver, por ejemplo, Arnon y otros, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld y otros (eds.), páginas. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y otros, "Antibodies For Drug Delivery," en Controlled Drug Delivery (2da Ed.), Robinson y otros (eds.), páginas. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera y otros (eds.), páginas. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin y otros (eds.), páginas. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe y otros, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

Como se usa en la presente descripción, un anticuerpo se "deriva de" una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema mediante la inmunización a un animal o mediante la selección de una biblioteca de genes de inmunoglobulina, y en donde el anticuerpo seleccionado es al menos 90 %, con mayor preferencia al menos 95 %, incluso con mayor preferencia al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo derivado de una secuencia de línea germinal particular mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos, con mayor preferencia, no más de 5, o incluso con mayor preferencia, no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácido codificada por el gen de la inmunoglobulina de la línea germinal.

Como se usa en la presente descripción, el término "heteroanticuerpos" se refiere a dos o más anticuerpos, sus derivados, o regiones de unión al antígeno enlazadas entre sí, al menos dos de las cuales tienen especificidades diferentes. Estas diferentes especificidades incluyen una especificidad de unión por un receptor de Fc en una célula efectora, y una especificidad de unión por un antígeno o epítipo en una célula diana, por ejemplo, una célula tumoral.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser anticuerpos monoclonales. El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente descripción se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal presenta una especificidad de unión y afinidad únicas. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B que se obtiene de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, que se fusiona a una célula inmortalizada.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser anticuerpos recombinantes. El término "anticuerpo recombinante", como se usa en la presente descripción, incluye todos los anticuerpos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos que se aíslan de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina o un hibridoma que se prepara a partir de estos, (b) anticuerpos que se aíslan de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos que se aíslan de una biblioteca recombinante, combinatoria, de anticuerpos y (d) anticuerpos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por cualquier otro medio que involucre el empalme de secuencias génicas de la inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

El término "transfectoma", como se usa en la presente descripción, incluye células huésped eucariotas recombinantes que expresan un anticuerpo, tales como células CHO, células NS/0, células HEK293, células HEK293T, células vegetales, u hongos, que incluyen células de levadura.

Como se usa en la presente descripción, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con un organismo transgénico que produce tal anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante que corresponde a la que se encuentra en un organismo que no es el organismo transgénico, y que generalmente se deriva de una especie distinta a la del organismo transgénico.

Como se usa en la presente descripción, un "anticuerpo heterohíbrido" se refiere a un anticuerpo que tiene cadenas ligeras y pesadas de diferentes organismos de origen. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una cadena pesada humana asociada con una cadena ligera murina es un anticuerpo heterohíbrido.

La invención incluye todos los anticuerpos y derivados de anticuerpo como se describen en la presente descripción los que para los fines de la invención se encuentran abarcados dentro del término "anticuerpo". El término "derivados de anticuerpos" se refiere a cualquier forma modificada de un anticuerpo, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción son, preferentemente, aislados. Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a PLAC1, está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de PLAC1). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de PLAC1 humano puede tener, sin embargo, reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de PLAC1 de otras especies). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o químicos. En una modalidad de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" se refiere a los anticuerpos que tienen especificidades diferentes y que se combinan en una composición o mezcla bien definida.

El término "unión" de acuerdo con la invención, se refiere preferentemente a una unión específica.

De acuerdo con la presente invención, un anticuerpo es capaz de unirse a una diana predeterminada si tiene una afinidad significativa por dicha diana predeterminada y se une a dicha diana predeterminada en ensayos estándar. La "afinidad" o "afinidad de unión" a menudo se mide, por la constante de disociación en equilibrio (K_D). Preferentemente, el término "afinidad significativa" se refiere a la unión a una diana predeterminada con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} M o inferior, 10^{-6} M o inferior, 10^{-7} M o inferior, 10^{-8} M o inferior, 10^{-9} M o inferior, 10^{-10} M o inferior, 10^{-11} M o inferior, o 10^{-12} M o inferior.

Un anticuerpo no es (sustancialmente) capaz de unirse a una diana si no tiene una afinidad significativa por dicha diana y no se une significativamente, en particular no se une de manera detectable a dicha diana en ensayos estándar. Preferentemente, el anticuerpo no se une de manera detectable a dicha diana si está presente en una concentración de hasta 2, preferentemente 10, con mayor preferencia 20, en particular 50 o 100 µg/ml o superior. Preferentemente, un anticuerpo no tiene afinidad significativa por una diana si se une a dicha diana con una K_D que es al menos 10 veces, 100 veces, 10^3 -veces, 10^4 -veces, 10^5 -veces, o 10^6 -veces mayor que la K_D para unirse a la diana predeterminada a la cual el anticuerpo es capaz de unirse. Por ejemplo, si la K_D para la unión de un anticuerpo a la diana a la cual el anticuerpo es capaz de unirse es 10^{-7} M, la K_D para unirse a una diana para la cual el anticuerpo no tiene afinidad significativa sería de al menos 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, o 10^{-1} M.

Un anticuerpo es específico para una diana predeterminada si es capaz de unirse a dicha diana predeterminada mientras que no es capaz de unirse a otras dianas, es decir, no tiene afinidad significativa por otras dianas y no se une significativamente a otras dianas en ensayos estándar. De acuerdo con la invención, un anticuerpo es específico para PLAC1 si es capaz de unirse a PLAC1 pero no es (sustancialmente) capaz de unirse a otras dianas. Preferentemente, un anticuerpo es específico para PLAC1 si la afinidad por y la unión a tales otras dianas no excede significativamente la afinidad por o la unión a proteínas no relacionadas con PLAC1 tales como albúmina de suero bovina (BSA), caseína, albúmina de suero humana (HSA) o proteínas transmembrana que no son claudinas, tales como moléculas de MHC o receptor de transferrina o cualquier otro polipéptido especificado. Preferentemente, un agente es específico para una diana predeterminada si se une a dicha diana con una K_D que es al menos 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, o 10^6 veces menor que la K_D de unión a una diana para la que no es específico. Por ejemplo, si la K_D de unión de un anticuerpo a la diana para la que es específico es 10^{-7} M, la K_D de unión a una diana para la que no es específico pudiera ser de al menos 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, o 10^{-1} M.

La unión de un anticuerpo a una diana puede determinarse experimentalmente mediante el uso de cualquier método adecuado; ver, por ejemplo, Berzofsky y otros, "Antibody-Antigen Interactions" en Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press Nueva York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman y Company Nueva York, N Y (1992), y los métodos que se describen en la presente descripción. Las afinidades pueden determinarse fácilmente mediante el uso de técnicas convencionales, tales como la diálisis de equilibrio; mediante el uso del instrumento BIAcore 2000, mediante el uso de procedimientos generales delineados por el fabricante; por radioinmunoensayo mediante el uso del antígeno diana radiomarcado; o por otro método conocido por el experto en la materia. Los datos de afinidad pueden analizarse, por ejemplo, mediante el método de Scatchard y otros, Ann N.Y. Acad. ScL, 51:660 (1949). La afinidad que se mide a una interacción particular antígeno anticuerpo puede variar si se mide bajo condiciones diferentes, por ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de la afinidad y otros parámetros de unión al antígeno, por ejemplo, K_D , IC_{50} , se llevan a cabo preferentemente, con las soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado.

Como se usa en la presente descripción, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que codifican los genes de la región constante de la cadena pesada.

Como se usa en la presente descripción, "cambio de isotipo" se refiere al fenómeno por el cual la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.

El término "presente de manera natural" como se usa en la presente descripción como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de un polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluidos los virus) que puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio, está presente de manera natural.

El término "reordenado" como se usa en la presente descripción se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera en donde un segmento V está ubicado inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio completo V_H o V_L , respectivamente. Un locus del gen de la inmunoglobulina (anticuerpo) reordenado puede identificarse por comparación con el ADN de la línea germinal; un locus reordenado tendrá al menos un elemento de homología de heptámero/nonámero recombinado.

El término "no reordenado" o "configuración de línea germinal" como se usa en la presente descripción en referencia a un segmento V se refiere a la configuración en donde el segmento V no se recombina para estar inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en la presente descripción, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

De acuerdo con la presente invención, el término "expresión" se usa en su significado más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína/péptido. Comprende también la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede llevarse a cabo de forma transitoria o estable.

Para los propósitos de la presente invención, las "variantes" de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de delección de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. Las variantes de delección de aminoácidos que comprenden la delección en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína se denominan también variantes de truncamiento N-terminal y/o C-terminal.

Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos particular. En el caso de las variantes de secuencias de aminoácidos que tienen una inserción, se insertan uno o más residuos de aminoácidos en un sitio particular en una secuencia de aminoácidos, aunque es posible también una inserción aleatoria con el tamizaje apropiado del producto resultante.

Las variantes de adición de aminoácidos comprenden fusiones aminoterminal y/o carboxiterninal de uno o más aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, o más aminoácidos.

Las variantes de delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tales como por la eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, o más aminoácidos. Las delecciones pueden estar en cualquier posición de la proteína.

Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de al menos un residuo en la secuencia y la inserción de otro residuo en su lugar. La preferencia está dada a las modificaciones que están en las posiciones de la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre las proteínas o péptidos homólogos y/o al reemplazo de aminoácidos con otros que tienen propiedades similares. Preferentemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteína son cambios conservadores de aminoácidos, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados o no cargados de manera similar. Un cambio conservador de aminoácidos involucra la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que se relacionan en sus cadenas laterales. Los aminoácidos presentes de manera natural se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato), aminoácidos básicos (lisina, arginina, histidina), aminoácidos no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y aminoácidos polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). En ocasiones la fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

Preferentemente el grado de similitud, preferentemente de identidad entre una secuencia de aminoácidos determinada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de la secuencia de aminoácidos determinada será de al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %. El grado de similitud o de identidad está dado preferentemente para una región del aminoácido que es al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o aproximadamente 100 % de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consiste en 200 aminoácidos, el grado de similitud o de identidad se da preferentemente para al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180, o aproximadamente 200 aminoácidos, preferentemente aminoácidos continuos. En modalidades preferidas, el grado de similitud o identidad está dado por la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia. El alineamiento para determinar la similitud de secuencia, preferentemente, la identidad de secuencia, puede realizarse con herramientas conocidas en la técnica, preferentemente mediante el uso del mejor alineamiento de secuencia, por ejemplo, mediante el uso de Align, mediante el uso de configuraciones estándar, preferentemente, EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

La "similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservadoras de aminoácidos. La "identidad de secuencia" entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias.

El término "porcentaje de identidad" pretende indicar un porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias a comparar, se obtiene después del mejor alineamiento, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen en forma aleatoria y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente mediante la comparación de estas secuencias después de haberlas alineado de forma óptima, dicha comparación se lleva a cabo por segmento o por "ventana de comparación" con el fin de identificar y comparar las regiones locales con similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación puede producirse, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, o por medio de programas de ordenador que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula mediante la determinación del número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, se divide este número entre el número de posiciones comparadas, y se multiplica el resultado obtenido por 100 de forma que se obtiene el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

5 Los términos "animal transgénico" se refieren a un animal que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes, preferentemente transgenes de cadena pesada y/o ligera, o transcromosomas (ya sea integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es preferentemente capaz de expresar los transgenes. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y un transgén de cadena pesada humana o un transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpos humanos anti-PLAC1 cuando se inmuniza con antígeno PLAC1 y/o células que expresan PLAC1. El transgén de la cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, los ratones HuMAb, tales como los ratones HCo7 o HCo2, o el transgén de la cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como el caso para ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento núm. WO 02/43478. Tales ratones transgénicos y transcromosómicos pueden ser capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para PLAC1 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) al someterse a recombinación V-D-J y cambio de isotipo.

Como se usa en la presente descripción "reducir" o "inhibir" significan la capacidad para causar una disminución global, preferentemente de 5 % o mayor, 10 % o mayor, 20 % o mayor, con mayor preferencia de 50 % o mayor, y con la máxima preferencia de 75 % o mayor en el nivel, por ejemplo, en el nivel de proliferación de las células.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden producirse mediante una variedad de técnicas, que incluyen la metodología convencional de anticuerpos monoclonales por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales por ejemplo, la transformación viral u oncogénica de los linfocitos B o técnicas de presentación en fagos mediante bibliotecas de genes de anticuerpos.

El sistema animal que prefiere para la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. También se conocen las parejas de fusión (por ejemplo, las células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión. Otros sistemas de animales que se prefieren para la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales son el sistema de rata y el de conejo (por ejemplo se describen en Spieker-Polet y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995), ver también Rossi y otros, Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

Aún en otra modalidad preferida, los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse mediante el uso de ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones conocidos como HuMAb y KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en la presente descripción como "ratones transgénicos". La producción de anticuerpos humanos en tales ratones transgénicos puede realizarse como se describe en detalle para CD20 en el documento núm. WO2004 035607

Otra estrategia más para generar anticuerpos monoclonales es aislar directamente los genes que codifican los anticuerpos de linfocitos que producen anticuerpos de especificidad definida, por ejemplo, ver Babcock y otros, 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. Para obtener detalles sobre la ingeniería de anticuerpos recombinantes, consulte también Welschof y Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8 y Benny KC Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1.

Para generar los anticuerpos, los ratones pueden inmunizarse con portadores de péptidos conjugados derivados de la secuencia del antígeno, es decir, la secuencia contra la cual los anticuerpos deben dirigirse, una preparación enriquecida de antígeno expresado de manera recombinante o fragmentos de este y/o células que expresan el antígeno, como se describió. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica el antígeno o fragmentos de este. En caso de que las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida del antígeno no resulten en anticuerpos, los ratones pueden también inmunizarse con células que expresan el antígeno, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunitarias.

La respuesta inmunitaria puede monitorearse en el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma y suero que se obtienen por la vena de la cola o sangrados retroorbitales. Los ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina pueden usarse para fusiones. Los ratones pueden reforzarse de manera intraperitoneal o intravenosa con células que expresan antígeno 3 días antes del sacrificio y la eliminación del bazo para aumentar la tasa de hibridomas que secretan anticuerpos específicos.

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales, pueden aislarse los esplenocitos y las células de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden luego tamizarse para la producción de anticuerpos

específicos del antígeno. Los pocillos individuales pueden luego tamizarse mediante ELISA para hibridomas que secretan anticuerpos. Por análisis de Inmunofluorescencia y FACS mediante el uso de las células que expresan el antígeno, pueden identificarse los anticuerpos con especificidad para el antígeno. Los hibridomas que secretan el anticuerpo pueden replaquearse, tamizarse de nuevo, y si todavía son positivos para los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse por dilución limitante. Los subclones estables pueden después cultivarse in vitro para generar anticuerpos en medio de cultivo tisular para la caracterización.

Los anticuerpos de la invención pueden producirse también en un transfectoma de células huésped mediante el uso, por ejemplo, de una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como se conoce bien en la técnica (Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Por ejemplo, en una modalidad, el o los genes de interés, por ejemplo, genes de anticuerpos, pueden ligarse en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como se usa por el sistema GS de expresión del gen descritos en los documentos núms. WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpos clonados puede introducirse en células huésped eucariotas, tales como las células CHO, células NS/0, células HEK293T o células HEK293 o alternativamente otras células eucariotas como células derivadas de plantas, células fúngicas o de levadura. El método que se usa para introducir estos genes puede estar entre los métodos que se describen en la técnica, tales como electroporación, lipofectina, lipofectamina u otros. Después de la introducción de estos genes de anticuerpos en las células huésped, las células que expresan el anticuerpo pueden identificarse y seleccionarse. Estas células representan los transfectomas que luego pueden amplificarse para su nivel de expresión y aumentar su escala de producción de anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes pueden aislarse y purificarse a partir de estos sobrenadantes de cultivo y/o células.

Alternativamente, los genes de anticuerpos clonados pueden expresarse en otros sistemas de expresión, que incluyen las células procariontas, tales como microorganismos, por ejemplo, *E. coli*. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales transgénicos no humanos, tales como en la leche de ovejas y conejos o en huevos de gallinas, o en plantas transgénicas; ver por ejemplo Verma, R., y otros (1998) *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181; Pollock, y otros (1999) *J. Immunol. Meth.* 231: 147-157; y Fischer, R., y otros (1999) *Biol. Chem.* 380: 825-839.

30 Quimerización

Los anticuerpos monoclonales murinos pueden usarse como anticuerpos terapéuticos en humanos cuando se marcan con toxinas o isótopos radiactivos. Los anticuerpos murinos no marcados son altamente inmunogénicos en el hombre cuando se aplican repetidamente lo que conduce a la reducción del efecto terapéutico. La inmunogenicidad principal está mediada por las regiones constantes de la cadena pesada. La inmunogenicidad de los anticuerpos murinos en el hombre puede reducirse o evitarse completamente si los respectivos anticuerpos se quimerizan o humanizan. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos, cuyas diferentes porciones se derivan de diferentes especies de animales, tales como aquellos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana. La quimerización de anticuerpos se logra por la unión de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo murino con la región constante de las cadenas pesada y ligera humana (por ejemplo como se describió por Kraus y otros, en *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). En una modalidad que se prefiere los anticuerpos quiméricos se generan mediante la unión de la región constante de la cadena ligera kappa humana a la región variable de la cadena ligera murina. En una modalidad que también se prefiere, los anticuerpos quiméricos pueden generarse mediante la unión de la región constante de la cadena ligera lambda humana a la región variable de la cadena ligera murina. Las regiones constantes de la cadena pesada que se prefieren para la generación de los anticuerpos quiméricos son IgG1, IgG3 e IgG4. Otras regiones constantes de la cadena pesada que se prefieren para la generación de los anticuerpos quiméricos son IgG2, IgA, IgD e IgM.

50 Humanización

Los anticuerpos interactúan con los antígenos dianas predominantemente a través de los residuos de aminoácidos que se localizan en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones antígeno-anticuerpo, es posible expresar anticuerpos recombinantes que mimeticen las propiedades de los anticuerpos específicos presentes de manera natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo específico presente de manera natural injertado en las secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver, por ejemplo, Riechmann, L. y otros (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. y otros (1986) *Nature* 321: 522-525; y Queen, C. y otros (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 10029-10033). Tales secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas de ADN que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal diferirán de las secuencias génicas del anticuerpo maduro porque no incluirán los genes variables completamente ensamblados, que se forman por la unión V (D) J durante la maduración de la célula B. Las secuencias de genes de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad a nivel individual uniformemente a través de la región variable.

La capacidad de los anticuerpos para unirse a un antígeno puede determinarse mediante el uso de ensayos de unión estándar (por ejemplo, ELISA, transferencia Western, Inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo).

5 Para purificar los anticuerpos, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en frascos giratorios de dos litros para la purificación del anticuerpo monoclonal. Alternativamente, los anticuerpos pueden producirse en biorreactores basados en diálisis. Los sobrenadantes pueden filtrarse y, si es necesario, concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa. Las IgG eluidas pueden verificarse mediante la electroforesis en gel y la cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La solución tampón puede intercambiarse con PBS, y la concentración puede determinarse mediante OD280 mediante el uso de un coeficiente de extinción de 1.43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -80 °C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales seleccionados se unen a epítopos únicos, puede usarse mutagénesis dirigida a sitio o dirigida a sitios múltiples.

15 Para determinar el isotipo de los anticuerpos, pueden realizarse ELISA de isotipo con varios kits comerciales (por ejemplo, Zymed, Roche Diagnostics). Los pocillos de las placas de microtitulación pueden recubrirse con Ig anti-ratón. Después del bloqueo, las placas se hacen reaccionar con anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. Los pocillos pueden hacerse reaccionar con IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3, IgA de ratón o sondas conjugadas con peroxidasa específicas de IgM de ratón. Después del lavado, las placas pueden revelarse con sustrato ABTS (1 mg/ml) y analizarse a una OD de 405-650. Alternativamente, puede usarse el kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón IsoStrip (Roche, No. Cat. 1493027) según lo descrito por el fabricante.

25 Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan antígeno, puede usarse citometría de flujo. Las líneas celulares que expresan el antígeno natural o después de la transfección y los controles negativos que carecen de la expresión del antígeno (cultivadas en condiciones de crecimiento estándar) pueden mezclarse con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en sobrenadantes de hibridoma o en PBS que contiene un 1 % de FBS, y pueden incubarse a 4 °C durante 30 minutos. Después del lavado, el anticuerpo anti IgG marcado con APC o Alexa647 puede unirse al anticuerpo monoclonal unido a antígeno en las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse mediante citometría de flujo con un instrumento FACS mediante el uso de las propiedades de dispersión lateral de la luz para atravesar las células vivas únicas. Con el fin de distinguir los anticuerpos monoclonales específicos de antígeno de los ligandos no específicos en una única medición, puede emplearse el método de cotransfección. Las células transfectadas transitoriamente con plásmidos que codifican el antígeno y un marcador fluorescente pueden teñirse como se describió anteriormente. Las células transfectadas pueden detectarse en un canal de fluorescencia diferente al de las células teñidas con anticuerpos. Como la mayoría de las células transfectadas expresan ambos transgenes, los anticuerpos monoclonales antígeno específicos se unen preferentemente a las células que expresan marcadores de fluorescencia, mientras que los anticuerpos no específicos se unen en una proporción comparable a las células no transfectadas. Puede usarse un ensayo alternativo con microscopía de fluorescencia además de o en lugar del ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se describió anteriormente y se examinaron mediante microscopía de fluorescencia.

45 Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos en los sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan antígeno, puede usarse el análisis de microscopía de inmunofluorescencia. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan el antígeno de forma espontánea o después de la transfección y los controles negativos que carecen de la expresión del antígeno se cultivan en portaobjetos de cámara en condiciones de crecimiento estándar en medio DMEM/F12, complementado con suero fetal de ternera (FCS) al 10 %, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 UI/ml y estreptomycinina 100 µg/ml. Las células pueden luego fijarse con metanol o paraformaldehído o dejarlas sin tratar. Las células pueden hacerse reaccionar con anticuerpos monoclonales contra el antígeno durante 30 min. a 25 °C. Después del lavado, las células pueden reaccionar con un anticuerpo secundario IgG anti-ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) en las mismas condiciones. Las células se pueden examinar por microscopía de fluorescencia.

55 Pueden prepararse extractos de células que expresan antígeno y controles negativos apropiados y someterlos a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a las membranas de nitrocelulosa, se bloquearán y se analizarán con sondas con los anticuerpos monoclonales que se analizarán. La unión de IgG puede detectarse mediante el uso de peroxidasa anti-IgG de ratón y revelarse con sustrato ECL.

60 Los anticuerpos pueden probarse, además, para la reactividad con el antígeno mediante Inmunohistoquímica de una manera bien conocida por la persona experta, por ejemplo, por medio del uso de criosecciones fijadas con paraformaldehído o acetona o secciones de tejido embebidas en parafina fijadas con paraformaldehído de tejido no canceroso o muestras de tejido canceroso obtenidos de pacientes durante procedimientos quirúrgicos rutinarios o de ratones portadores de tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresan el antígeno espontáneamente o después de la transfección. Para la inmunotinción, los anticuerpos reactivos al antígeno pueden incubarse seguidos por anticuerpos conjugados de cabra anti-ratón o conjugados de cabra anti-conejo con peroxidasa de rábano (DAKO) de acuerdo con las instrucciones del vendedor.

Una inhibición general de la proliferación celular por anticuerpos puede detectarse con kits disponibles comercialmente. El kit de proliferación celular DELFIA (Perkin-Elmer, No. Cat. AD0200) es un inmunoensayo no isotópico basado en la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN de células en proliferación en microplacas. La BrdU incorporada se detecta mediante el uso de un anticuerpo monoclonal marcado con europio. Para permitir la detección de anticuerpos, las células se fijan y el ADN se desnaturaliza mediante el uso de solución Fix. El anticuerpo no unido se elimina por lavado y se agrega el inductor DELFIA para disociar los iones de europio del anticuerpo marcado en la solución, donde forman quelatos altamente fluorescentes con componentes del inductor DELFIA. La fluorescencia que se mide - mediante el uso de fluorometría resuelta en el tiempo en la detección -, es proporcional a la síntesis de ADN en la célula de cada pocillo.

El mapeo de epítomos reconocidos por anticuerpos puede realizarse como se describe en detalle en "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology) por Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 y en "Epitope Mapping: A Practical Approach "Practical Approach Series, 248 by Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan usualmente en una forma de dosificación uniforme y pueden prepararse en una forma conocida per se. La composición farmacéutica de la invención puede estar, por ejemplo, en forma de una solución o suspensión.

La composición farmacéutica de la invención puede comprender sales, sustancias tamponantes, conservantes, portadores, diluyentes y/o excipientes los que son preferentemente farmacéuticamente aceptables. El término "aceptable farmacéuticamente" se refiere a la no toxicidad de un material que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.

Las sales que no son farmacéuticamente aceptables pueden usarse para preparar sales farmacéuticamente aceptables y se incluyen en la invención. Las sales aceptables farmacéuticamente de este tipo comprenden de manera no limitante, aquellas preparadas a partir de los ácidos siguientes: ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Las sales aceptables farmacéuticamente pueden prepararse también como sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de calcio.

Las sustancias tampón adecuadas para su uso en una composición farmacéutica de la invención incluyen ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

Los conservantes adecuados para su uso en una composición farmacéutica de la invención incluyen cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

Una formulación inyectable puede comprender un excipiente aceptable farmacéuticamente tal como Lactato de Ringer.

El término "portador" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de una naturaleza natural o sintética, en el que el componente activo se combina con el fin de facilitar, potenciar o habilitar la aplicación. De acuerdo con la invención, el término "portador" también incluye uno o más agentes de relleno sólidos o líquidos, diluyentes o sustancias de encapsulación, que son adecuadas para la administración a un paciente.

Las sustancias portadoras posibles para la administración parenteral son por ejemplo agua estéril, Ringer, lactato de Ringer, solución de cloruro de sodio estéril, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros biocompatibles de lactida, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno.

El término "excipiente" cuando se usa en la presente descripción pretende indicar todas las sustancias que pueden estar presentes en una composición farmacéutica de la presente invención y que no son ingredientes activos tales como, por ejemplo, portadores, aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes tensioactivos, conservantes, emulsionantes, tampones, agentes saborizantes, o colorantes.

Los agentes y composiciones descritas en la presente descripción pueden administrarse por cualquier vía convencional, tal como por administración parenteral que incluye por inyección o infusión. La administración es preferentemente parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular.

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral comprenden usualmente una preparación acuosa o no acuosa estéril del componente activo, que es, preferentemente, isotónica para la sangre del receptor. Ejemplos de portadores y disolventes compatibles son la solución de Ringer y la solución de cloruro de sodio isotónica. Adicionalmente, se usan aceites fijados, usualmente estériles, como solución o medio de suspensión.

Los agentes y composiciones descritas en la presente descripción se administran en cantidades efectivas. Una "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado solo o junto con dosis adicionales. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o de una afección particular, la reacción deseada se relaciona, preferentemente, con la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende ralentizar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una

enfermedad o de una afección puede ser también un retraso en la aparición o una prevención de la aparición de dicha enfermedad o de dicha afección.

5 Una cantidad efectiva de un agente o composición de la que se describe en la presente descripción dependerá de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, que incluyen la edad, la condición fisiológica, la talla y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de una terapia de acompañamiento (si está presente), la vía específica de administración y factores similares. En consecuencia, las dosis administradas de los agentes que se describen en la presente descripción pueden depender de varios de tales parámetros. En el caso que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial pueden usarse dosis más altas (o dosis efectivamente mayores alcanzadas por una vía de administración diferente, más localizada).

15 Los agentes y composiciones descritas en la presente descripción pueden administrarse a los pacientes, por ejemplo, in vivo, para tratar o prevenir una variedad de trastornos tales como aquellos que se describen en la presente descripción. Los pacientes que se prefieren incluyen pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o mejorarse mediante la administración de los agentes y composiciones descritas en la presente descripción. Esto incluye trastornos que involucran células que se caracterizan por un patrón de expresión alterado de PLAC1 y/o un patrón alterado de asociación de PLAC1 con su superficie celular en comparación con las células normales.

20 Por ejemplo, en una modalidad, los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar a un paciente con una enfermedad cancerosa, por ejemplo, una enfermedad cancerosa que se caracteriza por la presencia de células cancerosas que expresan PLAC1 y/o se caracterizan por la asociación de PLAC1 con su superficie celular. Ejemplos de enfermedades cancerosas que pueden tratarse y/o prevenirse abarcan todos los cánceres que expresan PLAC1 e incluyen cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides y las formas metastásicas de estos. Estos cánceres pueden estar en etapas tempranas, intermedias o avanzadas, por ejemplo, metástasis. En una modalidad, la enfermedad cancerosa es cáncer metastásico en el pulmón.

30 Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento que se describen de acuerdo con la invención pueden usarse, además, para inmunización o vacunación para prevenir una enfermedad que se describe en la presente descripción.

35 Como se describió anteriormente, los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico, un agente antiangiogénico o un agente inmunosupresor para reducir la inducción de respuestas inmunitarias contra los anticuerpos. El anticuerpo puede estar vinculado al agente (como un inmunocomplejo) o puede administrarse por separado del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anticancerosa, por ejemplo, radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como los enumerados anteriormente. La coadministración de los anticuerpos con agentes quimioterapéuticos puede proporcionar dos agentes anticancerígenos que operan a través de diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico para las células cancerosas. La coadministración puede resolver los problemas debidos al desarrollo de la resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células cancerosas que las harían no reactivas con el anticuerpo.

45 La presente invención se ilustra además mediante los ejemplos siguientes.

EJEMPLOS

50 Las técnicas y métodos mencionados en la presente descripción se llevan a cabo de la forma conocida per se y como se describen, por ejemplo, en Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2da Edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y, o como se describe más abajo. Todos los métodos, incluido el uso de kits y reactivos, se llevan a cabo de acuerdo con la información del fabricante.

55 Ejemplo 1: Propiedades de precipitación de diferentes mezclas de anticuerpos específicos de PLAC1

60 Se inmunoprecipitó PLAC1 humano por diferentes mezclas de anticuerpos de lisado de células BeWo; véase la Figura 1. El carril 1 muestra el 1 % del extracto de células BeWo que se usó, los carriles 2-4 muestran mezclas de anticuerpos monoclonales, que reconocen los extremos C-terminal (carriles 3, 4, 1:1:1) o N-terminal (carril 5, 1:1) del PLAC1 humano. El carril 6 muestra las propiedades de precipitación de una mezcla de anticuerpos policlonales (1:1), dirigida contra el extremo C-terminal del PLAC1 humano. Los carriles 7 y 8 muestran inmunoprecipitaciones de control de lisado de BeWo de IgG de ratón o conejo, respectivamente.

65 Esto demuestra que una mezcla de anticuerpos contra PLAC1 puede precipitar mucho mejor el PLAC1 nativo que otras mezclas. Este efecto probablemente se deba a una mayor cobertura de epítopos accesibles en el PLAC1 multimérico.

Ejemplo 2: Los anticuerpos monoclonales específicos de PLAC1 humanos bloquean la unión de PLAC1 a FGF7

5 El GST-FGF7 purificado y expresado bacteriamente se inmovilizó en una matriz de sefarosa (1 mg cada una, carriles 3-22, entrada total de proteína GST-FGF7 usada, gel después de la transferencia, panel superior de la Figura 2) y se incubó con lisado de células HEK293T que sobreexpresan PLAC1 que se preincubó durante una hora a 4 °C con diferentes anticuerpos monoclonales (10 mg), dirigidos contra PLAC1 humano. El carril 2 muestra el 100 % del lisado de PLAC1 que se utilizó en este ensayo. Los carriles 3-14 muestran el anticuerpo contra PLAC1 dirigido contra el extremo C-terminal de PLAC1, los carriles 15-16 muestran el anticuerpo dirigido contra el extremo N-terminal de PLAC1. Los carriles 18-21 muestran los controles de isotipo IgG y el carril 22 muestra la unión de PLAC1 a GST-FGF7 sin preincubación con anticuerpos. Las interacciones se evaluaron mediante elución de las proteínas que interactúan mediante la ebullición en tampón de muestra de SDS seguido por SDS-PAGE e inmunotransferencia con anticuerpos específicos (panel inferior de la Figura 2).

15 Esto demuestra que los anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra PLAC1 humano pueden bloquear la interacción entre rec. GST-FGF7 y PLAC1. Es interesante que todos los anticuerpos probados, derivados de una lista condensada que refleja sus transferencias de Western y sus propiedades de IP pueden bloquear la unión. Sólo los anticuerpos que no pueden inmunoprecipitar (carriles 15, 16) PLAC1 no están efectuando la unión de FGF7 en este ensayo *in vitro*.

20 Ejemplo 3: FGFR2IIIb y PLAC1 coinmunoprecipitan con FGF7

Las células HEK293T que expresan FGF7, PLAC1 y una proteína de fusión de conejo IgG-FGFR2III (D1-D3) se sometieron a coinmunoprecipitación con un anticuerpo específico de FGF7 (carril 3 de la Figura 3). La IP con las IgG sirvió como control (carril 2 de la Figura 3).

25 Esto demuestra que PLAC1 interactúa específicamente con FGF7 y, de esta manera, forma un complejo con el receptor FGFR2IIIb *in vivo*.

30 Ejemplo 4: PLAC1 activa la fosforilación de Akt por estimulación específica y activación del receptor FGFR2IIIb

35 Como se demuestra en la Figura 4 (A), la estimulación de las células BeWo con FGF7 conduce a una fosforilación específica de las proteínas del nodo señal Akt (en Thr308 (1) y Ser473 (2)), así como también MAPK (3). También se activan la proteína S6 (4) y Src (5). Como se demuestra en la Figura 4 (B), la estimulación de Akt está influenciada por PLAC1. La fosforilación de Akt Ser473 inducida por FGF7 (panel superior) se reduce en las células con desactivación génica de PLAC1 (k.d.) en comparación con las células control (control). El mismo efecto es detectable para Akt Thr308 (panel inferior, k.d. vs. control). Para el control interno, se detectaron Akt1, PLAC1 y β Aktin con anticuerpos específicos. Como se demuestra en la Figura 4 (C), solo el receptor FGFR2 se activa con FGF7 (2) en contraste con FGFR1 (1), FGFR (3) y FGFR (4) (control, lado izquierdo). En las células con desactivación génica de PLAC1 (k.d., lado derecho) esta activación de FGFR2 específica de FGF7 está bloqueada.

40 Ejemplo 5: La estimulación de Akt dependiente de FGF7 está influenciada por PLAC1 en células MCF7

45 Como se demuestra en la Figura 5, la fosforilación de Akt Ser473 inducida por FGF7 (panel superior) se reduce en las células con desactivación génica de PLAC1 (k.d.) en comparación con las células control (control). El mismo efecto es detectable para Akt Thr308 (panel inferior, k.d. vs. control). Para el control interno, se detectaron akt1, PLAC1 y β Aktin con anticuerpos específicos.

50 Ejemplo 6: La expresión de PLAC1 promueve la proliferación mediada por FGF7 de la línea celular de cáncer de mama MCF7

55 Las células MCF7 se transfectaron con una mezcla de dos dúplexes diferentes de ARNsi (Qiagen) dirigidos a PLAC1 y un dúplex de ARN de control no silenciador. Las células se cultivaron a bajas concentraciones de FCS y los medios se complementaron con o sin FGF7 (0 y 10 ng/ml). La proliferación se midió después de 24, 48 y 72 h mediante el uso del kit de proliferación celular DELFIA.

Como se demuestra en la Figura 6, la presencia de PLAC1 es necesaria para la proliferación mediada por FGF7 en la línea celular de cáncer MCF7 (cáncer de mama).

60 Ejemplo 7: La expresión de PLAC1 promueve la proliferación de células BeWo mediada por FGF7

Las células BeWo con una desactivación génica lentiviral de PLAC1 y los controles respectivos se estimularon con 50 ng/ml de FGF7 durante 48 h. El número de células se determinó mediante tinción con cristal violeta seguido por la medición de absorción a 560 nm. Los resultados se normalizaron para controlar la afección y se analizaron mediante ANOVA.

65 Como se demostró en la Figura 7, la presencia de PLAC1 es necesaria para la proliferación mediada por FGF7 en la línea celular de cáncer BeWo (coriocarcinoma).

Ejemplo 8: hPLAC1 promueve la adhesión de células BeWo a las superficies de cultivo celular

5 El desprendimiento dependiente de hPLAC1 se evaluó mediante tripsinización de células control o células BeWo lentivirales silenciadas por hPLAC1; véase la Figura 9. Las células restantes en la superficie después de la tripsinización se determinaron mediante tinción con cristal violeta (panel izquierdo) y mediante conteo del número de células desprendidas después de diferentes puntos de tiempo (panel derecho). El punto de tiempo a los 35 minutos sirve como control para un desprendimiento completo (media \pm DE, N = 4).

10 La Figura 8 demuestra que se requiere la presencia de PLAC1 para la adhesión de las células BeWo a las superficies. Ejemplo 9: Ensayo de desprendimiento de líneas celulares estables PLAC1

15 Se incubaron células HEK 293 transfectadas de manera estable con PLAC1 (dos clones), o el control simulado correspondiente con EDTA 5 mM, para separar las células de la superficie. La incubación se detuvo después de los puntos de tiempo definidos. Las células restantes en la superficie después de la incubación con EDTA se determinaron mediante tinción con cristal violeta. La cuantificación fotométrica se realizó a 560 nm. Los datos se normalizaron a la señal de células HEK 293 no tratadas (media \pm DE, N = 3).

20 La Figura 9 demuestra que se requiere una sobreexpresión de PLAC1 para la adhesión de células HEK a las superficies. Por lo tanto, PLAC1 revela ser un factor general para las interacciones celulares con el tejido circundante, lo que influye en procesos como la migración y la adhesión.

Listado de secuencias

25 <110> BioNTech AG y otros

<120> ANTICUERPOS Y MEZCLAS DE ANTICUERPOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

30 <130> 674-72

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40 <400> 1

45

50

55

60

65

ES 2 729 729 T3

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

50 Ile Gly Ser Met
210

55 <210> 2
<211> 194
<212> PRT
<213> Homo sapiens
60 <400> 2
65

ES 2 729 729 T3

1 Met His Lys Trp Ile Leu Thr Trp Ile Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Arg
 5 Ser Cys Phe His Ile Ile Cys Leu Val Gly Thr Ile Ser Leu Ala Cys
 10 Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Cys Ser Ser
 15 Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp
 20 Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn
 25 Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr
 30 Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu
 35 Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly
 40 Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala
 45 Ile Thr
 <210> 3
 <211> 822
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 3
 55
 60
 65

ES 2 729 729 T3

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

ES 2 729 729 T3

Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly
 260 265 270
 5
 Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile
 275 280 285
 10
 Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp
 290 295 300
 Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys His Ser Gly Ile Asn Ser Ser
 305 310 315 320
 15
 Asn Ala Glu Val Leu Ala Leu Phe Asn Val Thr Glu Ala Asp Ala Gly
 325 330 335
 20
 Glu Tyr Ile Cys Lys Val Ser Asn Tyr Ile Gly Gln Ala Asn Gln Ser
 340 345 350
 Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Lys Gln Gln Ala Pro Gly Arg Glu Lys
 355 360 365
 25
 Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile
 370 375 380
 30
 Gly Val Phe Leu Ile Ala Cys Met Val Val Thr Val Ile Leu Cys Arg
 385 390 395 400
 Met Lys Asn Thr Thr Lys Lys Pro Asp Phe Ser Ser Gln Pro Ala Val
 405 410 415
 35
 His Lys Leu Thr Lys Arg Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser
 420 425 430
 40
 Ala Glu Ser Ser Ser Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile
 435 440 445
 Thr Thr Arg Leu Ser Ser Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val
 450 455 460
 45
 Ser Glu Tyr Glu Leu Pro Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp
 465 470 475 480
 50
 Lys Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val
 485 490 495
 Val Met Ala Glu Ala Val Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala
 500 505 510
 55
 Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp
 515 520 525
 60
 65

ES 2 729 729 T3

5 Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys
 530 535 540
 His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro
 545 550 555 560
 10 Leu Tyr Val Ile Val Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr
 565 570 575
 Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn
 580 585 590
 15 Arg Val Pro Glu Glu Gln Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr
 595 600 605
 20 Tyr Gln Leu Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile
 610 615 620
 His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val
 625 630 635 640
 25 Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp
 645 650 655
 30 Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala
 660 665 670
 Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp
 675 680 685
 35 Ser Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro
 690 695 700
 40 Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly
 705 710 715 720
 His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met
 725 730 735
 45 Met Arg Asp Cys Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys
 740 745 750
 50 Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu
 755 760 765
 Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Gln Pro Leu Glu Gln Tyr Ser Pro Ser Tyr
 770 775 780
 55 Pro Asp Thr Arg Ser Ser Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser
 785 790 795 800
 60 Pro Asp Pro Met Pro Tyr Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile
 805 810 815
 Asn Gly Ser Val Lys Thr
 820

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal o una mezcla de anticuerpos monoclonales que se une al extremo C-terminal de PLAC1, preferentemente a la secuencia de aminoácidos que abarca los aminoácidos 23 al 212 de PLAC1 y bloquea la interacción entre PLAC1 y FGF7 para usar en un método para tratar el cáncer o para usar en el tratamiento de la metástasis del cáncer, en donde PLAC1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 10 2. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1 en donde las células cancerosas expresan PLAC1.
- 15 3. Un anticuerpo monoclonal o una mezcla de anticuerpos monoclonales que se une al extremo C-terminal de PLAC1, preferentemente a la secuencia de aminoácidos que abarca desde los aminoácidos 23 al 212 de PLAC1 y bloquea la interacción entre PLAC1 y FGF7 para usar en un método para tratar el cáncer o para usar en un método para tratar metástasis del cáncer, en donde PLAC1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 20 4. El anticuerpo monoclonal o mezcla de anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en donde las células cancerosas expresan PLAC1.
- 25 5. El anticuerpo monoclonal o mezcla de anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, que es capaz de inmunoprecipitar PLAC1.
- 30 6. El anticuerpo monoclonal o mezcla de anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la mezcla de anticuerpos monoclonales comprende dos o más anticuerpos monoclonales, cada uno de los dos o más anticuerpos monoclonales se unen a diferentes epitopos de PLAC1.
- 35 7. El anticuerpo monoclonal o la mezcla de anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde la mezcla de anticuerpos monoclonales comprende uno o más anticuerpos monoclonales que se unen a PLAC1 y (i) uno o más anticuerpos monoclonales que se unen a FGF7 y/o (ii) uno o más anticuerpos monoclonales que se unen a FGFR2IIIb.
- 40 8. El anticuerpo monoclonal o la mezcla de anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 que inhibe la fosforilación de FGFR2IIIb dependiente de FGF7 y/o la fosforilación de Akt dependiente de FGF7/FGFR2IIIb.
9. El anticuerpo monoclonal o la mezcla de anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la fosforilación de Akt tiene lugar en Thr308 y/o Ser473.
10. El anticuerpo monoclonal o la mezcla de anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 que inhibe la proliferación, migración y/o adhesión de células cancerosas.
11. El anticuerpo monoclonal o la mezcla de anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la proliferación, migración y/o adhesión de células cancerosas es dependiente de FGF7/FGFR2IIIb.

Fig. 1

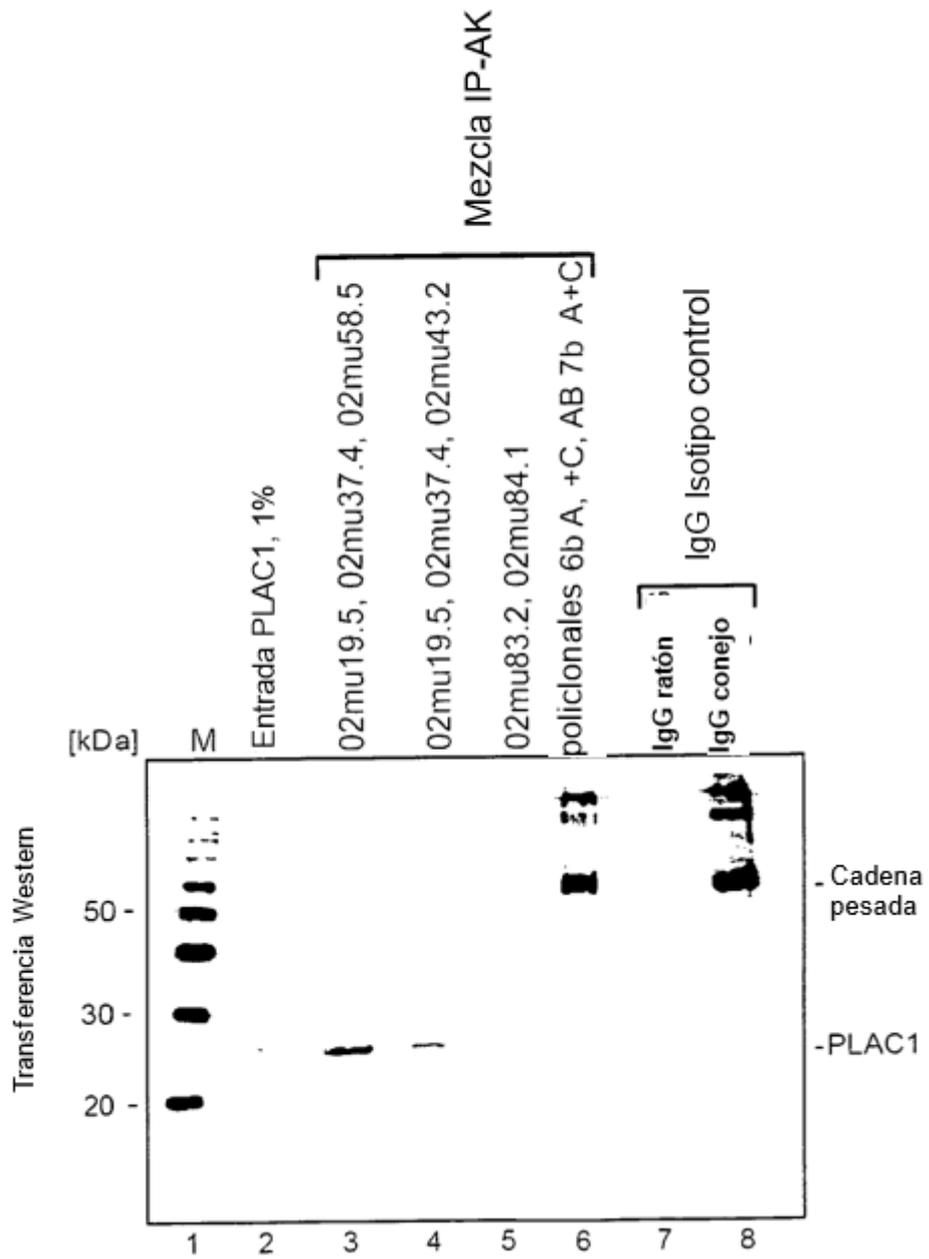


Fig. 2

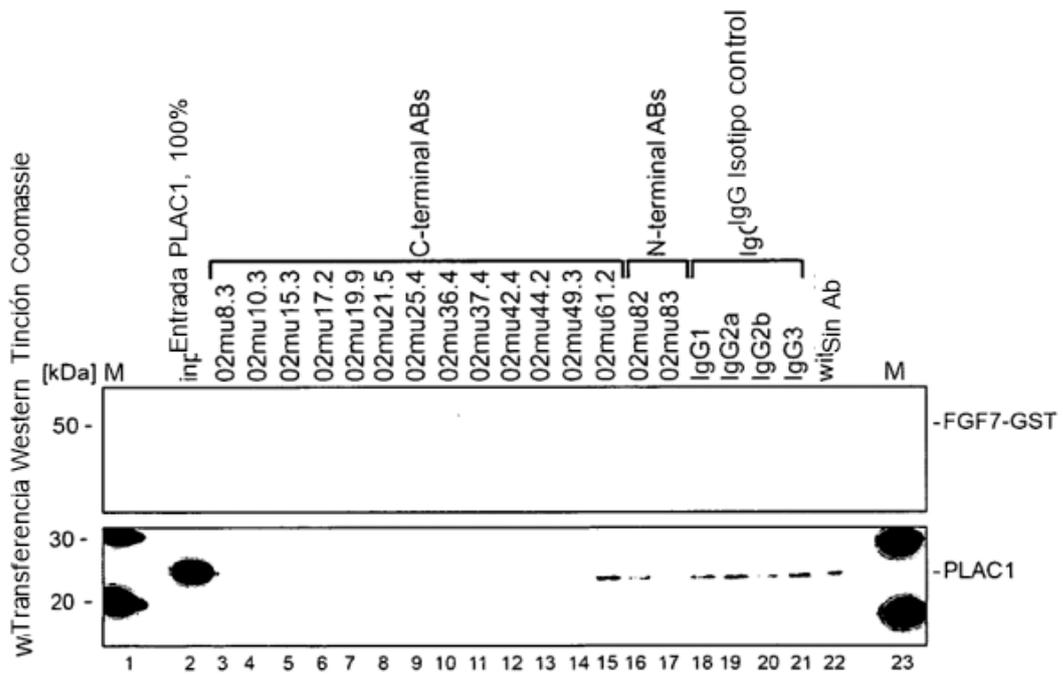


Fig. 3

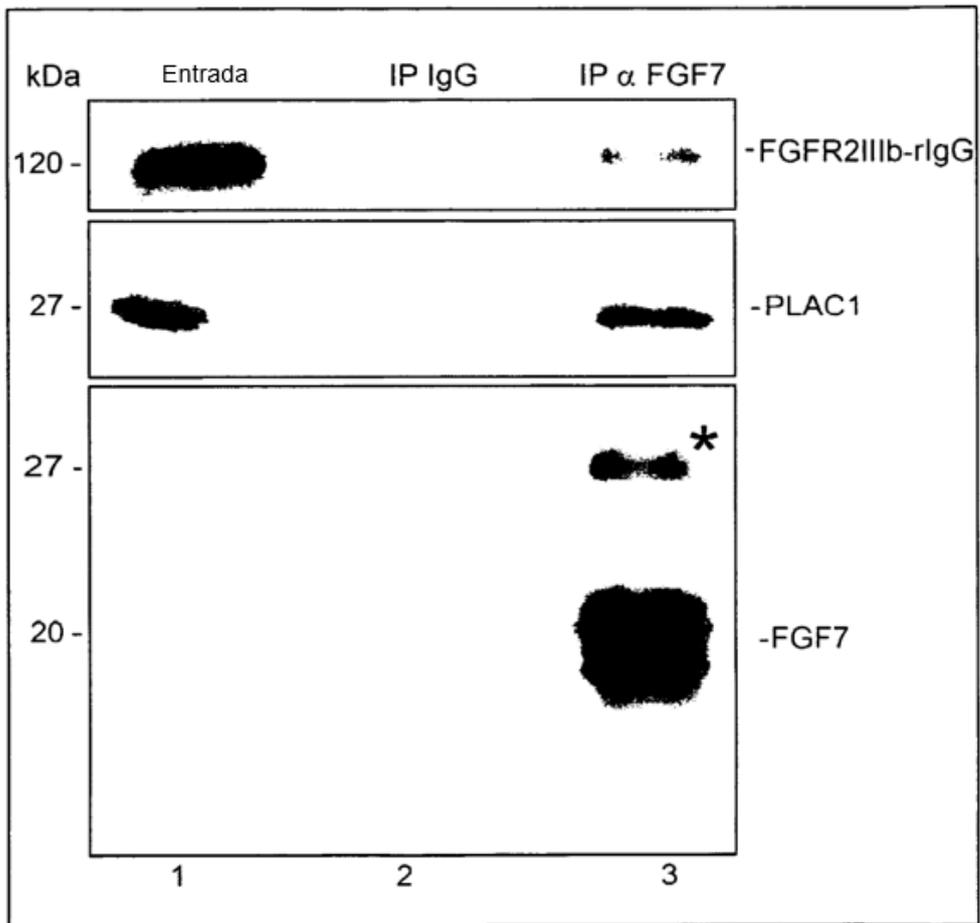


Fig. 4

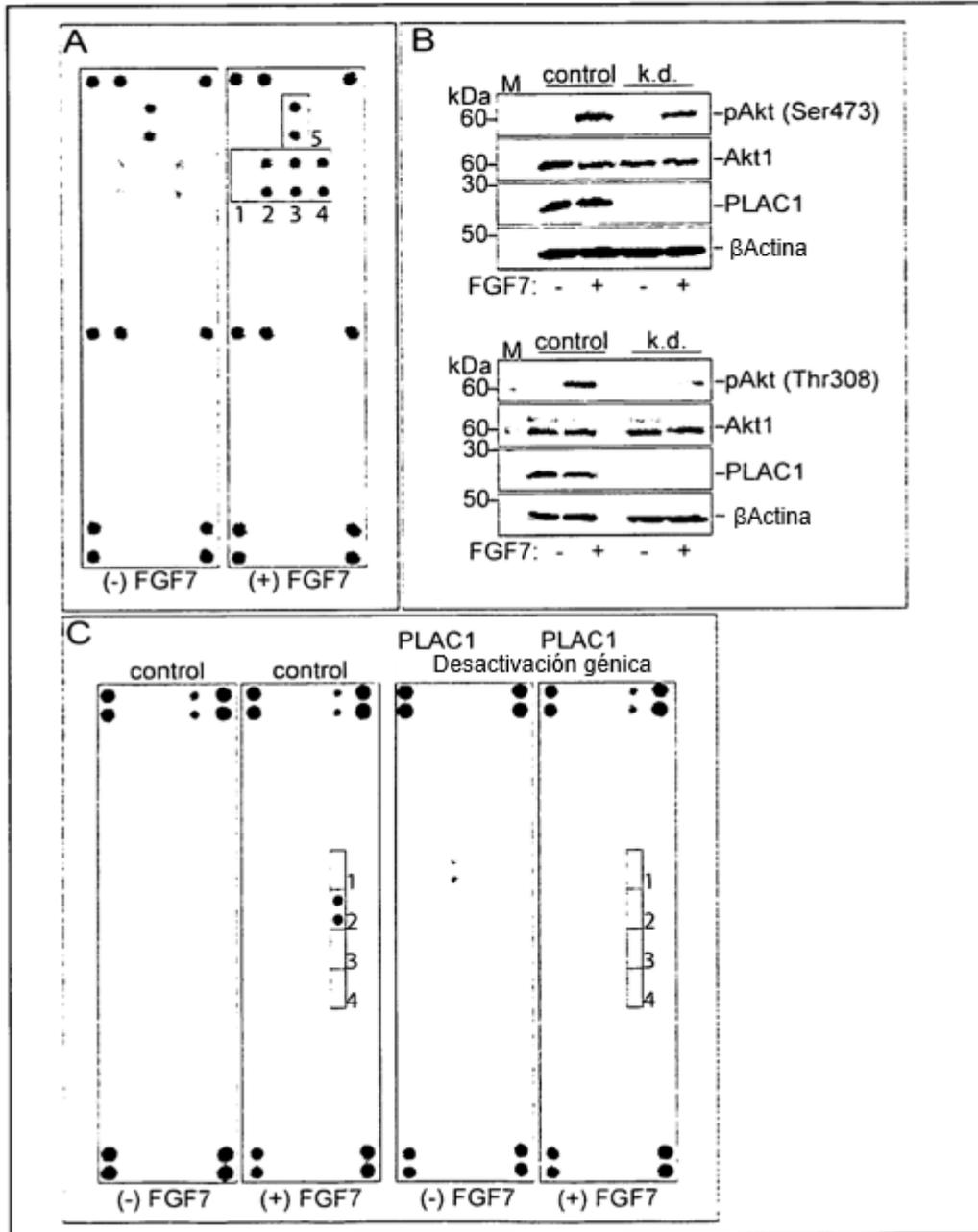


Fig. 5

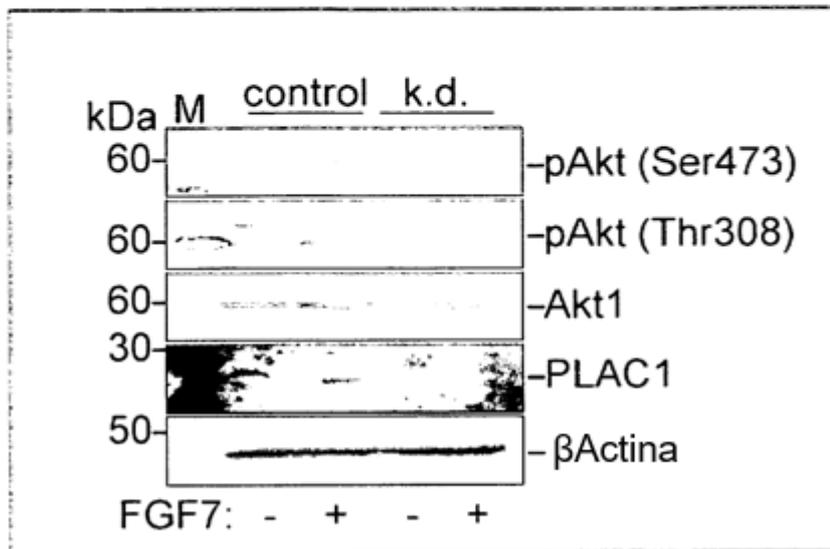


Fig. 6

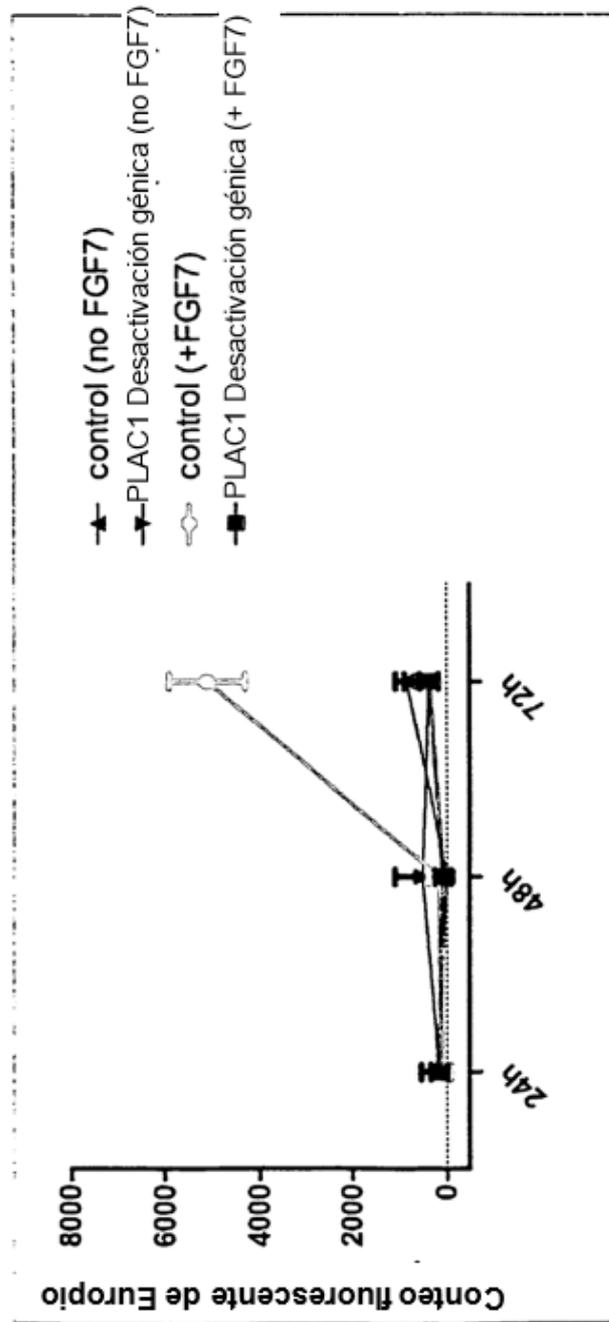


Fig. 7

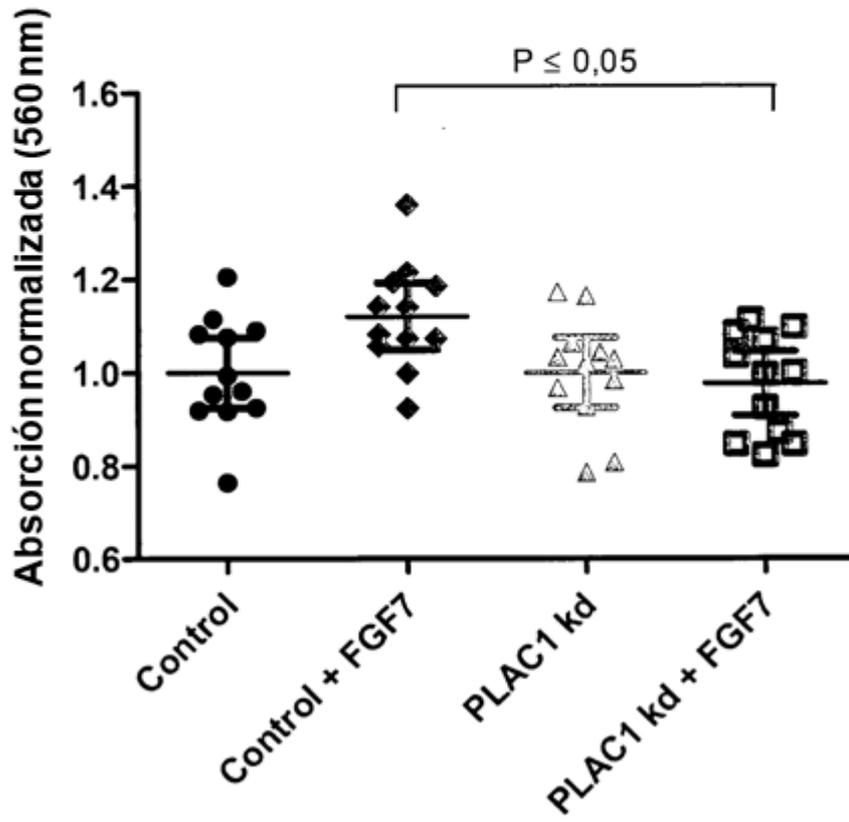


Fig. 8

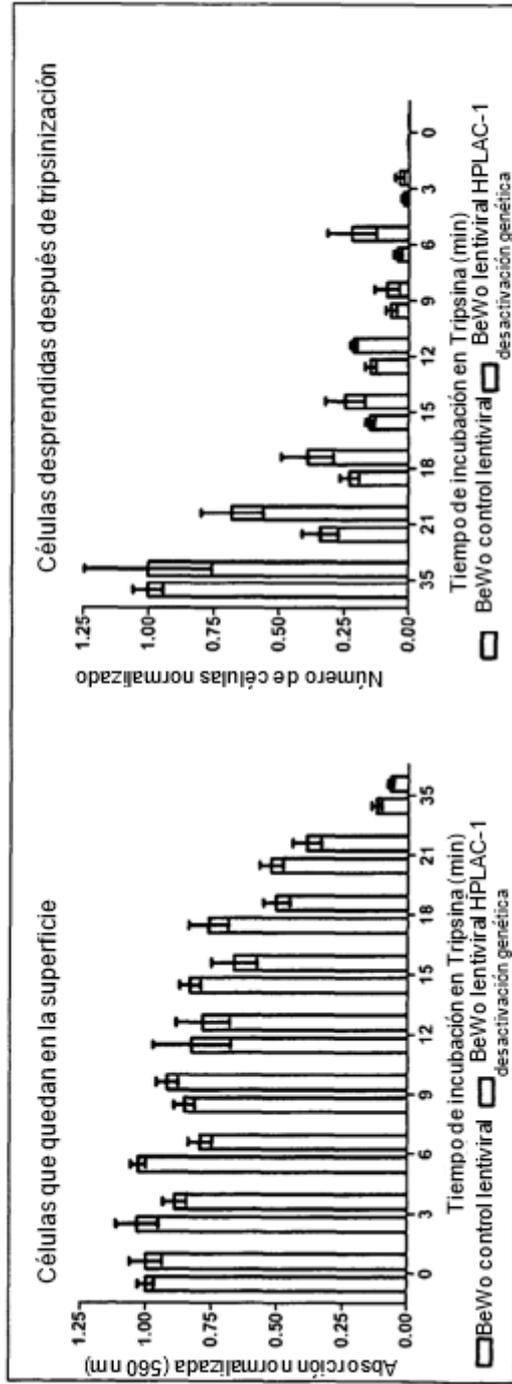


Fig. 9

