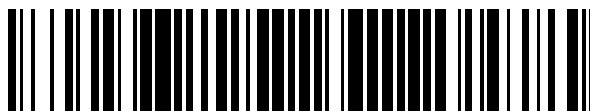


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 577**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2012 PCT/US2012/038476**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12158989**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2012 E 12725942 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2710037**

54 Título: **Agentes de fijación de la integrina alfa-2 y uso de los mismos para inhibir la proliferación de las células de cáncer**

30 Prioridad:

19.05.2011 US 201161487812 P

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

17.03.2020

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (100.0%)
Office of Technology Transfer, 1600 Huron Parkway, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48109-2590, US**

72 Inventor/es:

**WEISS, STEPHEN, J. y
DUDLEY, DAVID, T.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 748 577 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

Agentes de fijación de la integrina alfa-2 y uso de los mismos para inhibir la proliferación de las células de cáncer

Campo de la invención

5 Esta descripción se refiere en general a agentes de fijación de la integrina alfa-2, usos de los mismos, y métodos de selección de anticuerpos terapéuticamente eficaces.

Antecedentes de la invención

10 Las integrinas son una familia de receptores transmembranales heterodímeros α/β encontrados a lo largo de todo el desarrollo de los metazoos. Las integrinas están implicadas en diversos aspectos del comportamiento celular. Por ejemplo, las mismas median la fijación a proteínas de la matriz extracelular (ECM) y enlazan el entorno extracelular con eventos de señalización intracelulares. Las adhesiones celulares mediadas por integrinas inducen señalización celular que desencadena flujos de calcio, activa tirosina y serina/treonina proteína-quinasas y el metabolismo de los lípidos de inositol, y regula la actividad de GTPasas que controlan el citoesqueleto de actina. Además de mediar una adhesión estable, las integrinas juegan un papel en la motilidad celular. La migración celular es esencial para el desarrollo embrionario, las respuestas inmunes, y la reparación de los tejidos.

15 En los humanos, existen 24 integrinas funcionales diferentes formadas por la distinta combinación de 18 subunidades alfa (α) y 8 subunidades beta (β). Muchas integrinas se fijan a componentes de la matriz extracelular (ECM) tales como lamininas, colágenos, y fibronectina. La integrina alfa-2 beta-1 ($\alpha 2\beta 1$), por ejemplo, se fija al colágeno tipo I, la proteína ECM dominante en el cuerpo. La integrina alfa-2 es una de las 12 integrinas a que forma un receptor funcional con la subunidad de la integrina beta 1 (β_1). La integrina alfa-2 se ha encontrado solamente en vertebrados, y en humanos, la misma se expresa ampliamente en las células mesenquimáticas, epiteliales y endoteliales. Las plaquetas utilizan también integrina alfa-2 como su receptor de colágeno. La integrina alfa-2 se ha visto implicada en la invasión de las células de hepatocarcinoma a través del microentorno de la matriz fibrótica (Yang et al., *Cancer Res.*, 63, 8312 (2003)), en metástasis de esferoides de carcinoma ovárico (Shield et al., *J. Carcinogenesis*, 6, 11 (2007)), en metástasis al hígado (Yoshimura et al., *Cancer Res.*, 69: 18, 7320 (2009)), y en la adhesión e invasión de células de cáncer en el

25 cáncer de próstata (Van Slambrouk et al., *Int. J. Oncology*, 34, 1717 (2009)).

El cáncer sigue siendo una causa principal de muerte en todo el mundo, sucumbiendo a la enfermedad un número estimado de 500.000 americanos en 2010 (American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2010*. Atlanta, American Cancer Society; 2010). Sigue existiendo necesidad en la técnica de terapéuticas, y métodos de utilización de las mismas, que sean eficaces en el tratamiento, la prevención, o la mejora de la proliferación de las células de cáncer.

30 Compendio de la invención

La descripción proporciona un agente de fijación de la integrina alfa-2 que bloquea en cruz la fijación de al menos uno de los anticuerpos 770.8, 778. 17, y 774.3 a la integrina alfa-2 y/o es bloqueado en cruz respecto a la fijación a la integrina alfa-2-por al menos uno de los anticuerpos 770.8, 778. 17, y 774.3.

35 La descripción proporciona adicionalmente un agente de fijación de la integrina alfa-2 que comprende al menos una secuencia de CDR que tiene al menos 75% de identidad con una secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, y 18. Por ejemplo, en un aspecto, el agente de fijación de la integrina alfa-2 comprende: (a) una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 19, y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 20; (b) una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 21, y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 22; o (c) una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 23, y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 24. En diversos aspectos, el agente de fijación de la integrina alfa-2, es un anticuerpo, p. ej. una inmunoglobulina que tiene cadenas pesada y ligera. En una realización, el agente de fijación de la integrina alfa-2 es un fragmento de anticuerpo. Se proporcionan también un polinucleótido aislado que codifica el agente de fijación de la integrina alfa-2, un proceso para producir el agente de fijación de la integrina alfa-2, y una composición farmacéutica que comprende el agente de fijación de la integrina alfa-2.

45 La invención proporciona un anticuerpo de la integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo que se fija a una o ambas de SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33. En diversos aspectos, el anticuerpo de la integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo inhibe la proliferación de las células de cáncer en cultivo celular tridimensional. El anticuerpo de la integrina alfa-2 es, p. ej., una inmunoglobulina que tiene cadenas pesada y ligera, o un fragmento de la misma.

55 Adicionalmente, la descripción incluye un método de inhibición de la proliferación de las células de cáncer. El método comprende poner en contacto células de cáncer con una cantidad de un agente de fijación de la integrina alfa-2 eficaz para inhibir la proliferación de las células de cáncer. Las células de cáncer pueden encontrarse en un individuo, y el contacto comprende administrar el agente de fijación de la integrina alfa-2 al individuo. La descripción incluye además

un método de modulación del crecimiento tumoral en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una composición que comprende un agente de fijación de la integrina alfa-2 en una cantidad eficaz para modular el crecimiento tumoral en el individuo.

5 Se proporcionan también métodos de producción de un anticuerpo y agentes de selección para la actividad inhibidora de las células de cáncer. Por ejemplo, la descripción incluye un método de producción de un anticuerpo que comprende los pasos de (a) propagar células de cáncer en una matriz tridimensional; (b) inmunizar un mamífero con las células de cáncer propagadas; y (c) aislar un anticuerpo o fragmento de fijación a antígeno del mismo a partir del mamífero inmunizado. Opcionalmente, el método comprende además (d) probar el anticuerpo o fragmento de fijación a antígeno del mismo en cuanto a actividad anticáncer. Se incluye también en la descripción un método de identificación de un agente que inhibe la proliferación de las células de cáncer, comprendiendo el método los pasos de (a) realizar un ensayo de competición con un agente candidato y un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo 770.8, anticuerpo 778. 17, y anticuerpo 774.3 o un fragmento de fijación a antígeno de cualquiera de los anteriores. El método comprende adicionalmente aislar un agente candidato que (i) está bloqueado respecto a la fijación de un polipéptido de la integrina alfa-2 de SEQ ID NO: 25 por el anticuerpo 770.8, el anticuerpo 778. 17, el anticuerpo 774.3, o un fragmento de fijación a antígeno de cualquiera de los anteriores o (ii) bloquea la fijación del anticuerpo 770.8, el anticuerpo 778. 17, el anticuerpo 774.3, o un fragmento de fijación a antígeno de cualquiera de los anteriores a la integrina alfa-2.

20 Se proporcionan también métodos de tratamiento de trastornos fibróticos. Por ejemplo, la descripción incluye un método de tratamiento de un trastorno fibrótico en un individuo que comprende administrar al individuo una composición que comprende un agente de fijación de la integrina alfa-2, tal como uno de los anticuerpos 770.8, 778. 17, y 774.3. En algunos aspectos, el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad crónica renal, enfermedad crónica hepática, fibrosis pulmonar, esclerosis sistémica, fibrosis de trasplante de órganos, fibrosis endomiocárdica, fibrosis del mediastino, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, Enfermedad de Crohn, y artrofibrosis.

25 Se proporcionan también métodos de inhibición de la angiogénesis. Por ejemplo, la descripción incluye un método de inhibición de la angiogénesis en un individuo que comprende administrar al individuo una composición que comprende un agente de fijación de la integrina alfa-2, tal como uno de los anticuerpos 770.8, 778. 17, y 774.3, en una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis en el individuo.

30 Otros rasgos distintivos y ventajas de la presente descripción resultarán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue. No obstante, debería entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones específicas de la descripción, se dan únicamente a modo de ilustración, dado que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la descripción resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada. Debe entenderse que el documento completo pretende ser considerado como una descripción unificada, y debería comprenderse que se contemplan todas las combinaciones de rasgos distintivos descritas en esta memoria, aun cuando la combinación de rasgos distintivos no se encuentre en la misma frase, o párrafo, o sección de este documento. Además de lo que antecede, la descripción incluye, como un aspecto adicional, todas las realizaciones de la descripción más estrechas en alcance de cualquier manera que las variaciones anteriores mencionadas específicamente. Por ejemplo, si algún o algunos aspectos de la descripción se describen como "que comprende(n)" un rasgo característico, se contemplan también realizaciones "que consiste(n) en" o "que consiste(n) específicamente" en dicho rasgo característico.

Descripción detallada de la invención

45 La invención proporciona anticuerpos de la integrina alfa-2 o fragmentos de fijación de antígeno de los mismos, p. ej., para inhibir la proliferación de las células de cáncer. Una secuencia ilustrativa de aminoácidos de la integrina alfa-2 se proporciona como SEQ ID NO: 25. El heterodímero $\alpha 2\beta 1$ es un receptor de afinidad alta para muchos subtipos de colágeno. Un dominio insertado, a saber, el dominio I (denominado también un dominio A), en la integrina alfa-2 facilita el reconocimiento de ligandos de colágeno. La integrina alfa-2 comparte estos rasgos distintivos (la presencia de dominio alfa I y rasgos distintivos funcionales de fijación y asociación de colágeno con $\beta 1$) con integrina alfa-1, integrina alfa-10 e integrina alfa-11. Además de fijarse a los colágenos, la integrina $\alpha 2\beta 1$ se fija a varias otras proteínas, que incluyen lamininas, endorepellina y decorina.

50 La descripción incluye un agente de fijación de la integrina alfa-2 que bloquea en cruz la fijación de al menos uno de los anticuerpos 770.8, 778. 17, y 774.3 a la integrina alfa-2 y/o está bloqueado en cruz respecto a la fijación a la integrina alfa-2 por al menos uno de los anticuerpos 770.8, 778. 17, y 774.3. Un "agente de fijación a la integrina alfa-2" se fija específicamente a la integrina alfa-2 o porciones de la misma para bloquear o deteriorar la fijación de los anticuerpos 770.8, 778.17, o 774.3 de la integrina humana alfa-2 y, opcionalmente, para bloquear o deteriorar la fijación de la integrina alfa-2 humana y, opcionalmente, para bloquear o empeorar la fijación de la integrina alfa-2 humana a uno o más ligandos, tales como los ligandos descritos en esta memoria. A este respecto, el agente de fijación de la integrina alfa-2 se fija preferiblemente a la integrina alfa-2 expresada en la superficie de una célula de mamífero (p. ej. humana.). El agente de fijación de la integrina alfa-2 puede fijar un epítipo extracelular de la integrina alfa-2 expuesto en una célula de cáncer. Opcionalmente, la integrina alfa-2 comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 60 25. La descripción proporciona también un agente de fijación de la integrina alfa-2 que se fija a un epítipo de la

integrina alfa-2 que es fijado por Ab 770.8, Ab 778.17, o Ab 774.3.

Conforme a la invención, el agente de fijación de la integrina alfa-2 es un anticuerpo o fragmento de fijación a antígeno del mismo. Cualquier tipo de anticuerpo es adecuado en el contexto de la invención, con inclusión de versiones policlonales, monoclonales, quiméricas, humanizadas, o humanas que tienen cadenas pesada y/o ligera de longitud total. La invención incluye también fragmentos de anticuerpo que retienen características de fijación de la integrina alfa-2. Los fragmentos de anticuerpo incluyen regiones de fijación de antígeno del anticuerpo, p. ej. fragmentos F(ab')₂, Fab, Fab', Fd, Fc, y Fv (fragmentos que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera que están acoplados de modo no covalente), o anticuerpos mono-dominio (nanocuerpos). En términos generales, un dominio de región variable (V) puede ser cualquier disposición adecuada de dominios variables de cadena pesada (VH) y/o ligera (VL) de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, el dominio de región V puede ser dímero y contener dímeros VwVH, VwVL, o VL-VL que se fijan a la integrina alfa-2. En caso deseado, las cadenas VH y VL pueden estar acopladas de modo covalente directamente o a través de un enlazador para formar Fv de cadena simple Fv (scFv). Para facilidad de referencia, se hace referencia en esta memoria a las proteínas scFv como incluidas dentro de la categoría "fragmentos de anticuerpo". Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de un anticuerpo. Las CDRs (denominadas también "unidades de reconocimiento mínimas" o "región hipervariable") pueden obtenerse por construcción de polinucleótidos que codifican la CDR de interés. Tales polinucleótidos se preparan, por ejemplo, utilizando la reacción en cadena de polimerasa para sintetizar la región variable utilizando como plantilla mRNA de células productoras de anticuerpos (véase, por ejemplo, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 2:106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," en *Monoclonal Antibodies Production, Engineering y Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), página 166, Cambridge University Press (1995); y Ward et al., "Genetic Manipulation y Expression of Antibodies," en *Monoclonal Antibodies: Principies y Applications*, Birch et al., (eds.), página 137, Wiley-Liss, Inc. (1995)). Fragmentos de anticuerpo pueden incorporarse en anticuerpos monodominio, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, dominios variables de receptores de antígeno nuevos (v-NAR), y regiones Fv de cadena bis-simple (véase, p. ej., Hollinger y Hudson, *Nature Biotechnology*, 23(9): 1126-1136, 2005). En algunos aspectos, el agente de fijación contiene una región constante de cadena ligera y/o cadena pesada, tal como la región constante IgG4 o la IgG2.

En caso deseado, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (u otro agente de fijación de la integrina alfa-2) está conectado o fusionado a un resto con función efectora, tal como actividad citotóxica (p. ej., un resto quimioterapéutico o un radioisótopo) o actividad de reclutamiento inmune. Alternativamente o además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (u otro agente de fijación de la integrina alfa-2) está conectado o fusionado opcionalmente a un resto que facilita el aislamiento a partir de una mezcla (p. ej., un marcador) o un resto con actividad informadora (p. ej. una etiqueta de detección o proteína informadora). Se apreciará que los rasgos distintivos del anticuerpo o fragmento del mismo descritos en esta memoria se extienden también a un polipéptido que comprenda el fragmento de anticuerpo.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo se produce utilizando cualquier método adecuado, p. ej. se aísla de un animal inmunizado, generado recombinantemente o por síntesis, o fabricado por ingeniería genética. Fragmentos de anticuerpo derivados de un anticuerpo se obtienen, p. ej., por hidrólisis proteolítica de un anticuerpo. Por ejemplo, la digestión con papaína o pepsina de anticuerpos enteros produce un fragmento 5S denominado F(ab')₂ o dos fragmentos monovalentes Fab y un fragmento Fc, respectivamente. F(ab')₂ puede escindirarse ulteriormente utilizando un agente reductor tiol para producir fragmentos 3.5S Fab monovalentes. Métodos de generación de fragmentos de anticuerpo se describen adicionalmente en, por ejemplo, Edelman et al., *Methods in Enzymology*, 1: 422 Academic Press (1967); Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 89: 230-244, 1960; Porter, *Biochem. J.*, 73: 119-127, 1959; la Patente U. S. No.4,331,647; y por Andrews, S. M. y Titus, J. A. in *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al., eds.), John Wiley & Sons, Nueva York (2003), páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10A.1-2.10A.5.

Un anticuerpo o fragmento del mismo puede fabricarse también genéticamente. Por ejemplo, en diversos aspectos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende, p. ej., un dominio de región variable generado por técnicas de ingeniería de DNA recombinante. A este respecto, una región variable de anticuerpo está modificada opcionalmente por inserciones, deleciones, o cambios en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo para producir un anticuerpo de interés. Polinucleótidos que codifican regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de interés se preparan, por ejemplo, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar regiones variables que utilizan mRNA de células productoras de anticuerpos como plantilla (véase, por ejemplo, Courtenay Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering y Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), página 166 (Cambridge University Press 1995); Ward et al., "Genetic Manipulation y Expression of Antibodies," en *Monoclonal Antibodies: Principies y Applications*, Birch et al., (eds.), página 137 (Wiley Liss, Inc. 1995); y Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 2: 106-110, 1991). Las técnicas actuales de manipulación de anticuerpos permiten la construcción de dominios de región variable fabricados por ingeniería genética que contienen al menos una CDR y, opcionalmente, uno o más aminoácidos de entramado a partir de un primer anticuerpo y el resto del dominio de región variable de un segundo anticuerpo. Tales técnicas se utilizan, p. ej., para humanizar un anticuerpo o para mejorar su afinidad para una diana de fijación.

Los "anticuerpos humanizados" son anticuerpos en los cuales CDRs de cadenas variables pesada y ligera de inmunoglobulina no humana se transfieren a un dominio variable humano. No precisan estar presentes regiones constantes, pero si lo están, opcionalmente las mismas son sustancialmente idénticas a regiones constantes de

inmunoglobulina humana, es decir, al menos idénticas aproximadamente 85-90%, aproximadamente 95 % o más, en diversas realizaciones. Por tanto, en algunos casos, todas las partes de inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDRs, son sustancialmente idénticas a partes correspondientes de secuencias naturales de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, en un aspecto, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo hospedador) en las cuales residuos de región hipervariables del anticuerpo hospedador están reemplazadas por residuos de regiones hipervariables de una especie no humana (anticuerpo donante) tales como ratón, rata, conejo, o un primate no humano que tenga la especificidad, afinidad, y capacidad deseada.

En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo humano, tal como, pero sin carácter limitante, un anticuerpo que tiene regiones variables en las cuales tanto las regiones marco como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana como se describe, por ejemplo, en Kabat et al. (1991) *Sequences of proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U. S. Department of Health y Human Services, NIH Publication No.91-3242. Si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante se deriva también preferiblemente de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden comprender residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana para, p. ej., mejorar la actividad del anticuerpo, pero no comprenden CDRs derivadas de otras especies (es decir una CDR de ratón ubicada dentro de una región marco variable humana).

El anticuerpo o fragmento del mismo se fija preferiblemente con preferencia a la integrina alfa-2, lo que significa que el anticuerpo o su fragmento se fija a la integrina alfa-2 con mayor afinidad que lo hace a una proteína de control no afín. Más preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo reconoce específicamente y se fija a la integrina alfa-2 (o una porción de la misma). "Fijación específica" significa que el anticuerpo o fragmento del mismo se fija a la integrina alfa-2 con una afinidad que es al menos 5, 10, 15, 20,25, 50, 100,250, 500, 1000, o 10.000 veces mayor que la afinidad para una proteína de control no afín (p. ej., lisozima de clara de huevo de gallina). En algunas variaciones el anticuerpo o fragmento del mismo se fija a la integrina alfa-2 de modo sustancialmente exclusivo (es decir, es capaz de distinguir la integrina alfa-2 de otros polipéptidos conocidos (p. ej. otras integrinas) en virtud de diferencias medibles en afinidad de fijación). En otras variaciones, el agente de fijación de la integrina alfa-2 reacciona en cruz con otras secuencias de integrina.

En al menos un aspecto, el agente de fijación de la integrina alfa-2 bloquea en cruz la fijación de al menos uno de los anticuerpos 770.8, 778.17, y 774.3 a la integrina alfa-2. Alternativa o adicionalmente, el agente de fijación de la integrina alfa-2 está bloqueado en cruz en cuanto a la fijación a la integrina alfa-2 por al menos uno de los anticuerpos 770.8, 778.17, y 774.3. Los términos "bloqueo en cruz", "bloqueado en cruz", y "bloquear en cruz" se utilizan en esta memoria de modo intercambiable para significar la capacidad de un anticuerpo u otro agente de fijación para interferir con la fijación de otros anticuerpos o agentes de fijación a la integrina alfa-2. La extensión en la que un anticuerpo u otro agente de fijación es capaz de interferir con la fijación de otro a la integrina alfa-2, y por tanto si puede decirse que el mismo bloquea en cruz, puede determinarse utilizando ensayos de fijación de competición. En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo o fragmento del mismo que bloquea en cruz reduce la fijación a la integrina alfa-2 de un anticuerpo de referencia entre aproximadamente 40% y aproximadamente 100%, tal como aproximadamente 60% y aproximadamente 100%, específicamente entre 70% y 100%, y más específicamente entre 80% y 100%. Un ensayo cuantitativo particularmente adecuado para la detección del bloqueo en cruz y/o para determinar la especificidad/afinidad de fijación de un anticuerpo utiliza una máquina Biacore que mide la magnitud de las interacciones utilizando tecnología de resonancia de plasmones de superficie. Otro ensayo cuantitativo adecuado de bloqueo en cruz utiliza una estrategia basada en ELISA para medir la competición entre anticuerpos u otros agentes de fijación en términos de su fijación a la integrina alfa-2, que es adecuado también para determinar la especificidad/afinidad de fijación de un anticuerpo.

Ejemplos de agentes de fijación adecuados de la integrina alfa-2 incluyen la totalidad o parte de los elementos de fijación de antígeno de Ab 770.8, Ab 778.17, o Ab 774.3, con inclusión de la región variable de Ab 770.8, Ab 778.17, o Ab 774.3 (o cualquier otro anticuerpo de la invención). Por ejemplo, el agente de fijación de la integrina alfa-2 comprende opcionalmente la totalidad o parte de los elementos de fijación de antígeno de Ab 770.8, Ab 778.17, o Ab 774.3 en tanto que carece de la totalidad o parte de las regiones de entramado del anticuerpo. A este respecto, el agente de fijación de la integrina alfa-2 comprende opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis (es decir todas) las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de Ab 770.8, Ab 778.17, o Ab 774.3 (u otro anticuerpo de fijación de la integrina alfa-2 que inhibe la proliferación de las células de cáncer). Métodos de identificación de regiones determinantes de la complementariedad y regiones determinantes de especificidad se conocen en la técnica y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Tamura et al., *J. Immunol.*, 164: 1432-1441, 2000.

El anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender una o más de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. Al menos una de las regiones de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 puede tener al menos una sustitución de aminoácido, con tal que el agente de fijación retenga la especificidad de fijación de la CDR no sustituida. La porción distinta de CDR del agente de fijación puede ser una molécula no proteínica, en donde el agente de fijación bloquea en cruz la fijación de un anticuerpo descrito en esta memoria a la integrina alfa-2 y/o neutraliza la integrina alfa-2. La porción distinta de CDR del agente de fijación puede ser una molécula no proteínica en la cual el agente de fijación exhibe un patrón de fijación similar a los péptidos de la integrina alfa-2 humana en "ensayo de fijación de competición de un epitopo de péptidos de la integrina alfa-2 humana" como el exhibido por al menos uno de Ab 770.8, Ab 778.17, o Ab 774.3, y/o neutraliza la integrina alfa-2. La porción distinta de CDR del agente de fijación puede estar compuesta de aminoácidos, en donde el agente de fijación es una proteína de fijación

recombinante o un péptido sintético, y la proteína de fijación recombinante bloquea en cruz la fijación de un anticuerpo descrito en esta memoria a la integrina alfa-2 y/o neutraliza la integrina alfa-2. La porción distinta de CDR del agente de fijación puede estar compuesta de aminoácidos, en donde el agente de fijación es una proteína de fijación recombinante, y la proteína de fijación recombinante exhibe un patrón de fijación similar a los péptidos de la integrina alfa-2 en un ensayo de fijación de competición de un epítipo de péptidos de la integrina alfa-2 humana como el exhibido por al menos uno de los mAb 770.8, mAb 778.17, o mAb 774, y/o neutraliza la integrina alfa-2.

En el caso de que un agente de fijación de la integrina alfa-2 comprende uno o más de CDR-H1, CDR- H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 como se ha descrito anteriormente, el mismo puede obtenerse por expresión a partir de una célula hospedadora que contiene DNA codificante de estas secuencias. Un DNA que codifica cada secuencia de CDR puede determinarse sobre la base de la secuencia de aminoácidos de la CDR y sintetizarse junto con cualesquiera secuencias de DNA deseadas de entramado de región variable y región constante de anticuerpos utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos, mutagénesis orientada y técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en caso apropiado. El DNA codificante de entramado de región variable y región constante está ampliamente disponible para los expertos en la técnica a partir de bases de datos de secuencias genéticas tales como GenBank®. Las CDRs están localizadas típicamente en un marco de región variable en las posiciones 31-35 (CDR-H1), 50-65 (CDR-H2) y 95-102 (CDR-H3) de la cadena pesada y las posiciones 24-34 (CDR-L1), 50-56 (CDR-L2) y 89-97 (CDR-L3) de la cadena ligera conforme al sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., 1987 en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U. S. Department of Health and Human Services, NIH, U. S. A).

El agente de fijación de la integrina alfa-2 puede comprender al menos una secuencia de CDR que tiene al menos 75% de identidad (p. ej., al menos 85% de identidad o 100% de identidad) con una CDR seleccionada de SEQ ID Nos: 1-18. Preferiblemente, el agente de fijación de la integrina alfa-2 comprende secuencias de CDR que tienen al menos 75% de identidad (p. ej., al menos 85% de identidad o 100% de identidad) con al menos dos de las CDRs, al menos tres de las CDRs, al menos cuatro de las CDRs, al menos cinco de las CDRs, o al menos seis de las CDRs. Por ejemplo, agentes de fijación de la integrina alfa-2 adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes de fijación que comprenden a) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 1, 2, y 3; b) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 4, 5, y 6; c) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 7, 8, y 9; d) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 10, 11, y 12; e) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 13, 14, y 15; o f) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 16, 17, y 18, tales como agentes de fijación de la integrina alfa-2 que comprenden secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, y 6; secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 10, 11, y 12; o secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16, 17, y 18.

El agente de fijación de la integrina alfa-2 puede comprender al menos una secuencia de CDR que tiene al menos 75 % identidad con una CDR seleccionada de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 en donde CDR-H1 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 13, CDR-H2 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 14, CDR-H3 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 15, CDR-L1 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 16, CDR- L2 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 17 y CDR-L3 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 18. Opcionalmente, el agente de fijación de la integrina alfa-2 comprende tres CDRs, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 en donde (a) CDR-H1 es SEQ ID NO: 1, CDR-H2 es SEQ ID NO: 2, y CDR-H3 es SEQ ID NO: 3, (b) CDR-H1 es SEQ ID NO: 7, CDR-H2 es SEQ ID NO: 8, y CDR-H3 es SEQ ID NO: 9, o (c) CDR-H1 es SEQ ID NO: 13, CDR-H2 es SEQ ID NO: 14, y CDR-H3 es SEQ ID NO: 15. Alternativa o adicionalmente, el agente de fijación de la integrina alfa-2 comprende tres CDRs, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 en donde (a) CDR-L1 es SEQ ID NO: 4, CDR-L2 es SEQ ID NO: 5, y CDR-L3 es SEQ ID NO: 6, (b) CDR-L1 es SEQ ID NO: 10, CDR-L2 es SEQ ID NO: 11, y CDR-L3 es SEQ ID NO: 12, o (c) CDR-L1 es SEQ ID NO: 16, CDR-L2 es SEQ ID NO: 17, y CDR-L3 es SEQ ID NO: 18. En agentes de fijación de la integrina alfa-2 ilustrativos (a) CDR-H1 es SEQ ID NO: 1, CDR-H2 es SEQ ID NO: 2, CDR-H3 es SEQ ID NO: 3, CDR-L1 es SEQ ID NO: 4, CDR-L2 es SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 es SEQ ID NO: 6; CDR-H1 es SEQ ID NO: 7, CDR-H2 es SEQ ID NO: 8, CDR- H3 es SEQ ID NO: 9, CDR-L1 es SEQ ID NO: 10, CDR-L2 es SEQ ID NO: 11 y CDR-L3 es SEQ ID NO: 12; o CDR-H1 es SEQ ID NO: 13, CDR-H2 es SEQ ID NO: 14, CDR-H3 es SEQ ID NO: 15, CDR-L1 es SEQ ID NO: 16, CDR- L2 es SEQ ID NO: 17 y CDR-L3 es SEQ ID NO: 18.

En una realización, el agente de fijación de la integrina alfa-2 comprende una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia dada en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, o SEQ ID NO: 23 y/o una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia dada en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 24. A este respecto, el agente de fijación de la integrina alfa-2 puede comprender a la vez una cadena pesada y una cadena ligera en donde (a) la cadena pesada comprende un polipéptido que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia dada en SEQ ID NO: 19 y la cadena ligera comprende un polipéptido que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia dada en SEQ ID NO: 20; (b) la cadena pesada comprende un polipéptido que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia dada en SEQ ID NO: 21 y la cadena ligera comprende un polipéptido que tiene al menos 85% identidad con la secuencia dada en SEQ ID NO: 22; o (c) la cadena pesada comprende un polipéptido que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia dada en SEQ ID NO: 23 y la cadena ligera comprende un polipéptido que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia dada en SEQ ID NO: 24. El anticuerpo de la integrina alfa-2 o el fragmento de fijación a antígeno del mismo, en una realización, comprende cadenas pesadas que comprenden un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 19, y cadenas ligeras que comprenden un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 20; cadenas pesadas que comprenden un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO 21, y

cadena ligera que comprenden un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 22; o cadenas pesadas que comprenden un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 23, y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 24.

5 El agente de fijación de la integrina alfa-2 puede ser Ab 770.8 o un fragmento de fijación de la integrina alfa-2 del mismo. Ab 770.8 es un anticuerpo de ratón que se fija a la integrina alfa-2 humana e inhibe la proliferación de las células de cáncer. La secuencia de aminoácidos de la forma madura (eliminado el péptido señal) de la cadena ligera de Ab 770.8 se muestra en SEQ ID NO: 20:

10 DIVMTQSPAILSVPGERVVSFSCRASQSIGTSIHWYQQRNTNGSPRLL1KYVSEISIGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVES EDIADYYCQHSNRWPLTFGAGTKLELKRADAAPTVS (SEQ ID NO: 20). La secuencia de aminoácidos de CDR-L1 es QSIGTS (SEQ ID NO: 4). La secuencia de aminoácidos de CDR-L2 es YVS (SEQ ID NO: 5). La secuencia de aminoácidos de CDR-L3 es QHSNRWPLT (SEQ ID NO: 6).

La secuencia de ácido nucleico que codifica la forma madura (eliminado el péptido señal) de la cadena ligera de Ab 770.8 es SEQ ID NO: 27:

15 GATATTGTGATGACACAATCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGC CAGTCAGAGCATTGGCACAAGCATACTGGTATCAGCAAAGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCTATAAAGTA TGTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTCCAGGTTTGTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCAT CAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTACTGTCAACACAGTAATAGGTGGCCGCTCACGTTCCGGTGC TGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGA TGCTGCACCAACTGTATCC (SEQ ID NO: 27).

20 La secuencia de aminoácidos de la forma madura (enviado el péptido señal) de la cadena pesada de Ab 770.8 se muestra en SEQ ID NO: 19:

EVfLEESGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGAFYPGNSEDKYNENFKIKAKLTAVTSV NTVYMELSSLTSEDSAVYYCTRGTTLVAPGFDVWGAGTTVTSSAKTTPPSVYPLVP (SEQ ID NO: 19). La secuencia de aminoácidos de CDR-H1 es GYSFTSYW (SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos de CDR-H2 es FYPGNSED (SEQ ID NO: 2). La secuencia de aminoácidos de CDR-H3 es TRGTTLVAPGFDV (SEQ ID NO: 3).

25 La secuencia de ácido nucleico que codifica la forma madura (eliminado el péptido señal) de la cadena pesada de Ab 770.8 es SEQ ID NO: 26:

30 GAAGTGAAGCTGGAGGAGTCAGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTT CTGGCTACAGTTTTACTAGCTATTGGATGCACTGGGTAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTAGAATGGATTGGT GCTTTTTATCCTGGAAATAGTGAAGATAAATAACGAGAATTTCAAGATCAAGGCCAAACTGACTGCAGTCACAT CCGTCAATACTGTCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACAAGTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTACAAGAGGG ACTACGTTAGTAGCTCCGGGCTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACTACGGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGA CACCCCATCTG TCTATCCCTTGGTCCCT (SEQ ID NO: 26).

35 El agente de fijación de la integrina alfa-2 puede ser Ab 778.17 o un fragmento de fijación de la integrina alfa-2 del mismo. Ab 778.17 es un anticuerpo de ratón que se fija a la integrina alfa-2 e inhibe la proliferación de las células de cáncer. La secuencia de aminoácidos de la forma madura (eliminado el péptido señal) de la cadena ligera de Ab 778.17 se muestra en SEQ ID NO: 22:

40 DIVMTQTPTSLAVSLGQRATISCRASESVDSYDNSFMYWYQKPGQPPKLL1YFASNLESGVPARFSGSGSRTDFTL TIDPVEADDAATYYCQQNNEPDYTFGGGKLEIKRADAAPTVS (SEQ ID NO: 22). La secuencia de aminoácidos de CDR-L1 es ESDSYDNSF (SEQ ID NO: 10). La secuencia de aminoácidos de CDR-L2 es FAS (SEQ ID NO: 11). La secuencia de aminoácidos de CDR-L3 es QQNNEPDY (SEQ ID NO: 12).

La secuencia de ácido nucleico que codifica la forma madura (eliminado el péptido señal) de la cadena ligera de Ab 778.17 es SEQ ID NO: 29:

45 GATATTGTGATGACCCAGACTCCAACCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAGC CAGTGAAGTGTGATAGTTATGACAACAGTTTTATGTATTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCACCCAACT CCTCATCTATTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGTTCCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACT TCACCCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAAATAATGAGGATCCGT ACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC (SEQ ID NO: 29).

La secuencia de aminoácidos de la forma madura (eliminado el péptido señal) la cadena pesada de Ab 778.17 se muestra en SEQ ID NO: 21:

50 QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFASYWMNWVSRPEQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSS STAYIQLNSLTSEDSAVYYCARLGRGPFAYWGQGLVTVSAAKTTTPPSVY (SEQ ID NO: 21). La secuencia de aminoácidos of CDR-H1 es GYTFASYW (SEQ ID NO: 7). La secuencia de aminoácidos de CDR-H2 es IDPYDSET (SEQ ID NO: 8). La secuencia de aminoácidos de CDR-H3 es ARLGRGPFAY (SEQ ID NO: 9).

La secuencia de ácido nucleico que codifica la forma madura (eliminado el péptido señal) de la cadena pesada de Ab

778.17 es SEQ ID NO: 28:

5 CAGGTCCAACACTACAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTT
CTGGCTACACGTTTCGCCAGCTACTGGATGAACTGGGTTAGTCAGAGGCCTGAGCAAGGCCTTGAGTGGATTGG
AAGGATCGATCCTTACGATAGTAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCATATTGACTGTAGACAA
ATCCTCCAGCACAGCCTACATACTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATT
AGGGAGGGGGCCTTTTGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCCA
TCTGTCTAT (SEQ ID NO: 28).

10 El agente de fijación de la integrina alfa-2 puede ser Ab 774.3 o un fragmento de fijación de la integrina alfa-2 del mismo. Ab 774.3 es un anticuerpo de ratón que se fija a la integrina alfa-2. La secuencia de aminoácidos de la forma madura (eliminado el péptido señal) de la cadena ligera de Ab 774.3 se muestra en SEQ ID NO: 24:

GYSWCSrCKASQDVGTVAVAWYQQKPGQSPKLL1YWAATRHTGVPDRFAGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQ
YSTYPLTFGAGTKLELKRADAAPTVS (SEQ ID NO: 24). La secuencia de aminoácidos de CDR-L1 es QDVGTA (SEQ
ID NO: 16). La secuencia de aminoácidos de CDR-L2 es WAA (SEQ ID NO: 17). La secuencia de aminoácidos de
CDR-L3 es QQYSTYPLT (SEQ ID NO: 18).

15 La secuencia de ácido nucleico que codifica la forma madura (eliminado el péptido señal) de la cadena ligera de Ab 774.3 es SEQ ID NO: 31:

20 GGATACAGTTGGTGCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTAAGTCTGCTGTCGCCTGGTATCAACAGAA
ACCAGGGCAATCTCCTAAATACTGATTTACTGGGCAGCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCGCAG
GCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTC
AACAATATAGCACCTATCCACTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCA
ACTGTATCC (SEQ ID NO: 31).

La secuencia de aminoácidos de la forma madura (eliminado el péptido señal) de la cadena pesada de mAb 774.3 se muestra en SEQ ID NO: 23:

25 EVQLQESGPGPLVQPSQSLITCTVSGLSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNAAFISRLNIKKDNSKNQ
VFFKMNSLQVNDTVGSRNLSHRLLRESVLPKC (SEQ ID NO: 23). La secuencia de aminoácidos de CDR-H1 es
GLSLTNYG (SEQ ID NO: 13). La secuencia de aminoácidos de CDR-H2 es IWSSGNT (SEQ ID NO: 14). La secuencia
de aminoácidos de CDR- H3 es LSHRLL (SEQ ID NO: 15).

La secuencia de ácido nucleico que codifica la forma madura (eliminado el péptido señal) de la cadena pesada de Ab 774.3 es SEQ ID NO: 30:

30 GAGGTACAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACAGTCT
CTGGTTTGTCAATTAATAATTATGGTGTCCACTGGGTTCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGA
GTGATTTGGAGTGGTGGAAACACAGACTATAACGCAGCTTTCATATCCAGACTGAACATCAAGAAGGACAA TTC
CAAGAACCAAGTCTTCTTTAAAATGAACAGTCTGCAAGTTAATGACACAGTCGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCG
TCTCCTCAGAGAGTCAGTCCTTCCCAAATGT (SEQ ID NO: 30).

35 *Epítomos fijados por los agentes de fijación de la integrina alfa-2*

La invención proporciona adicionalmente un anticuerpo de la integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo que se fija a péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 (p. ej., péptido(s) que comprenden (o consisten en) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33). La integrina alfa-2 es una proteína de 1183 aminoácidos (número de acceso en Genbank AAM34795.1). Además de otros rasgos distintivos estructurales, el dominio de fijación de ligandos de la integrina alfa-2 es el dominio 1, homólogo al dominio β 1 encontrado en todas las subunidades de la integrina β . El mapeado de epítomos con una microrred de péptidos que consiste en un conjunto de péptidos 15-meros solapados por 10 residuos tomados de la subunidad de la integrina alfa-2 humana reveló que Ab 770.8, Ab 774.3, y Ab 778.17 reconocían péptidos de SEQ ID NO: 32 (YANNPRVVFNLNTYK) y SEQ ID NO: 33 (AIASIPTEYFFNVS). Estos péptidos mapean al dominio I de la integrina alfa-2 y comprenden adicionalmente la unión de la hoja β C y β F dentro de la estructura cristalina del dominio I de la integrina alfa-2. El dominio I de la integrina alfa-2 interacciona con el colágeno tipo 1 encontrado en la matriz extracelular.

Ab 770.8, Ab 774.3, y Ab 778.17 son ilustrativos y representativos de un grupo de anticuerpos que se fijan a péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33. Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) que tienen este patrón de fijación característico pueden compartir o no secuencia de aminoácidos en una o más regiones de la molécula del anticuerpo. La semejanza de anticuerpos se determina funcionalmente tal como por la capacidad para fijarse a los epítomos definidos por SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33. Los anticuerpos que exhiben un patrón de fijación similar o idéntico al de un anticuerpo Ab 770.8, Ab 774.3 y Ab 778.17 están incluidos en la invención. Por "similar a", se entiende, por ejemplo, que el anticuerpo se fijará a péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33, por lo que la preincubación del anticuerpo con la integrina alfa-2 o un fragmento peptídico de la integrina alfa-2 dará como resultado al menos una reducción del 50%

(p. ej., al menos 60%, al menos 70%, al menos 80 %, o al menos 90%) en la fijación del anticuerpo a la integrina alfa-2 que ocurriría en caso contrario en ausencia de la preincubación.

Materiales y Métodos para Producción de Anticuerpos y Fragmentos de los Mismos

5 El agente de fijación de la integrina alfa-2 es un anticuerpo o fragmento de fijación a antígeno del mismo. Los anticuerpos conforme a la invención se obtienen por cualquier método adecuado, tal como (pero sin limitación) inmunización con células tumorales enteras que comprenden integrina alfa-2 y una colección de anticuerpos, técnicas recombinantes, o bibliotecas de selección de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que utilizan epítomos del dominio extracelular de la integrina alfa-2. Los anticuerpos monoclonales de la invención se generan utilizando una diversidad de técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Coligan et al. (eds.), *Current Protocols in Immunology*, 1:2.5.12.6.7 (John Wiley & Sons 1991); *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn, y Bechtol (eds.) (1980); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); y Picksley et al., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*," in *DNA Cloning 2: Expression Systems*, Segunda Edición, Glover et al. (eds.), página 93 (Oxford University Press 1995)). Una técnica ilustrativa para generación de anticuerpos monoclonales comprende inmunizar un animal con un antígeno de la integrina alfa-2 y generar un hibridoma a partir de células de bazo obtenidas del animal. La invención proporciona un hibridoma que produce el anticuerpo o fragmento de anticuerpo monoclonal de inventiva.

20 Análogamente, se generan anticuerpos humanos por cualquiera de varias técnicas que incluyen, pero no se limitan a, transformación de células de sangre periférica humana del Virus Epstein Barr (EBV) (p. ej., que contienen linfocitos B, inmunización *in vitro* de células B humanas, fusión de células de bazo de ratones transgénicos inmunizados que contienen genes de inmunoglobulina humana insertados, aislamiento a partir de bibliotecas de fago de la región V de inmunoglobulina humana, u otros procedimientos como 6,054,927; 5,869,619; 5,861,155; 5,712,120; y 4,816,567.

25 La descripción proporciona adicionalmente materiales para generación de agentes de fijación de la integrina alfa-2, p. ej. anticuerpos de fijación de la integrina alfa-2 y fragmentos de los mismos. Por ejemplo, la descripción proporciona una célula aislada (p. ej., un hibridoma) que produce el agente de fijación de inventiva (es decir, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo). A este respecto la descripción incluye una célula (p. ej., una célula aislada) que produce Ab 770.8, Ab 778.17, o Ab 774.3. La invención incluye además un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el agente de fijación de la integrina alfa-2 de inventiva (es decir, anticuerpo o fragmento de anticuerpo). En diversos aspectos, el polinucleótido es un polinucleótido aislado y/o recombinante. En diversos aspectos de la descripción, el polinucleótido aislado comprende una secuencia nucleotídica que codifica una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y/o una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, en donde la VH y la VL comprenden regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) idénticas a las CDRs de mAb 770.8, mAb 778.17, o mAb 774.3. El polinucleótido comprende opcionalmente la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NOs: 26-31.

35 En una realización afín, la invención proporciona un vector de clonación o expresión que comprende un polinucleótido de la invención para dirigir la expresión del polinucleótido en una célula hospedadora adecuada. Tales vectores son útiles, p. ej., para amplificar los polinucleótidos en células hospedadoras a fin de crear cantidades útiles de los mismos, y para expresar péptidos, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, utilizando técnicas recombinantes. Los vectores son útiles también en regímenes de tratamiento por "terapia génica", en los cuales, por ejemplo, se introduce un polinucleótido codificante de un agente de fijación (p. ej., anticuerpo o fragmento del mismo) de la integrina alfa-2 en un individuo que sufre o se encuentra en riesgo de sufrir, por ejemplo, cáncer(es), fibrosis, o angiogénesis en una forma que hace que las células del individuo expresen el agente de fijación *in vivo*.

45 En realizaciones preferidas, el vector es un vector de expresión en el cual el polinucleótido de la invención está enlazado operativamente a un polinucleótido que comprende una secuencia de control de la expresión. Se contemplan específicamente constructos de expresión recombinantes que se replican autónomamente tales como vectores plasmídicos y virales de DNA que incorporan polinucleótidos de la invención. Secuencias de DNA de control de la expresión incluyen promotores, intensificadores, y operadores, y se seleccionan generalmente basándose en sistemas de expresión en los cuales va a utilizarse el constructo de expresión. Secuencias promotoras e intensificadoras preferidas se seleccionan generalmente por la capacidad para aumentar la expresión génica, mientras que las secuencias operadoras se seleccionan generalmente por su capacidad para regular la expresión génica. Los constructos de expresión de la invención pueden incluir también secuencias que codifican uno o más marcadores seleccionables que permiten la identificación de células hospedadoras que llevan incorporado el constructo. Los constructos de expresión pueden incluir también secuencias que facilitan, y preferiblemente promueven, recombinación homóloga en una célula hospedadora. Constructos de expresión preferidos de la invención incluyen también secuencias necesarias para replicación en una célula hospedadora.

55 Secuencias ilustrativas de control de la expresión incluyen secuencias promotoras/intensificadoras, p. ej., promotor/intensificador de citomegalovirus (Lehner et al., *J. Clin. Microbiol.*, 29: 2494-2502, 1991; Boshart et al., *Cell*, 41: 521-530, 1985); el promotor del virus del sarcoma de Rous (Davis et al., *Hum. Gene Ther.*, 4: 151, 1993); el promotor Tie (Korhonen et al., *Blood*, 86(5): 1828-1835, 1995); el promotor del virus 40 de los simios; DRA (regulado en sentido decreciente en el adenoma; Alrefai et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 293: G923-G934, 2007); MCT1 (transportador de monocarboxilato 1; Cuff et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, G977-

G979.2005); y Math1 (homólogo atonal 1 de ratón; Shroyer et al., *Gastroenterology*, 132: 2477-2478, 2007), para expresión en las células diana de mamífero, estando el promotor enlazado operativamente aguas arriba (es decir, 5') de la secuencia codificante del polipéptido (las descripciones de las referencias citadas se incorporan en esta memoria por referencia en su totalidad y particularmente con respecto a la discusión de las secuencias de control de la expresión). En otra variación, el promotor es un promotor específico de epitelio o promotor específico de endotelio. Los polinucleótidos de la invención pueden incluir también opcionalmente una secuencia de poliadenilación adecuada (p. ej., la secuencia de poliadenilación de SV40 o del gen de la hormona del crecimiento humana) enlazada operativamente aguas abajo (es decir, 3') de la secuencia codificante del polipéptido.

En caso deseado, el polinucleótido comprende también opcionalmente una secuencia nucleotídica que codifica un péptido señal secretor fusionado en marco con la secuencia del polipéptido. El péptido señal secretor dirige la secreción del polipéptido (p. ej., anticuerpo) de la invención por las células que expresan el polinucleótido, y es escindido por la célula del polipéptido secretado. El polinucleótido puede comprender opcionalmente además secuencias cuya única función propuesta es facilitar la producción del vector en gran escala, p. ej., en bacterias, tales como un origen de replicación bacteriano y una secuencia codificante de un marcador seleccionable. No obstante, si el vector se administra a un animal, tales secuencias extrañas están, con preferencia, al menos parcialmente escindidas. Pueden fabricarse y administrarse polinucleótidos para terapia génica utilizando procedimientos que han sido descritos en la bibliografía para otros transgenes. Véase, p. ej., Isner et al., *Circulation*, 91: 2687- 2692, 1995; e Isner et al., *Human Gene Therapy*, 7: 989- 1011, 1996.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la invención comprenden además secuencias adicionales que facilitan la absorción por las células hospedadoras y expresión del anticuerpo o fragmento del mismo (y/o cualquier otro péptido). En una realización, se emplea un transgén "desnudo" que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo descrito en esta memoria (es decir, un transgén sin un vector viral, liposómico, u otro que facilite la transfección.

Puede utilizarse cualquier vector adecuado que introduzca un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo en el hospedador. Vectores ilustrativos que se han descrito en la bibliografía incluyen vectores retrovirales deficientes en replicación, con inclusión, pero sin limitación, de vectores de lentivirus (Kim et al., *J. Virol.*, 72(1): 811-816, 1998; Kingsman & Johnson, *Scrip Magazine*, octubre de 1998, pp.43-46); vectores de parvovirus, tales como vectores virales adeno-asociados (AAV) (Núms. de Patente U. S. 5,474,935; 5,139,941; 5,622,856; 5,658,776; 5,773,289; 5,789,390; 5,834,441; 5,863,541; 5,851,521; 5,252,479; Gnatenko et al., *J. Invest. Med.*, 45: 87-98, 1997); vectores adenovirales (AV) (Núms. de Patente U. S. 5,792,453; 5,824,544; 5,707,618; 5,693,509; 5,670,488; 5,585,362; Quantin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 2581-2584, 1992; Stratford Perricaudet et al., *J. Clin. Invest.*, 90: 626-630, 1992; y Rosenfeld et al., *Cell*, 68: 143-155, 1992); un vector viral quimérico adenoviral adeno-asociado (Patente U. S. No.5,856,152) o un vector viral vaccinia o un vector de herpesvirus (Patentes U. S. Núms.5,879,934; 5,849,571; 5,830,727; 5,661,033; 5,328,688); transferencia génica mediada por Lipofectina (BRL); vectores liposómicos (Patente U. S. No.5,631,237); y combinaciones de los mismos. Cualquiera de estos vectores de expresión puede prepararse empleando técnicas estándar de DNA recombinante descritas, p. ej., en Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y. (1994). Opcionalmente, el vector viral se hace deficiente en replicación mediante, p. ej. delección o disrupción de genes seleccionados requeridos para la replicación viral.

Otros mecanismos de suministro no virales contemplados incluyen precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52: 456-467, 1973; Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7: 2745-2752, 1987; Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10: 689-695, 1990) DEAE-dextrano (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5: 1188-1190, 1985), electroporación (Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6: 716-718, 1986; Potter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81: 7161-7165, 1984), microinyección directa (Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101: 1094-1099, 1985, liposomas cargados con DNA (Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721: 185-190, 1982; Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76: 3348-3352, 1979; Feigner, *Sci Am.*, 276(6): 102-6, 1997; Feigner, *Hum Gene Ther.*, 7(15): 1791-3, 1996), sonicación de células (Fechheimer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84: 8463-8467, 1987), bombardeo de genes utilizando microproyectiles de alta velocidad (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87: 9568-9572, 1990), y transfección mediada por receptores (Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987; Wu y Wu, *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988; Wu y Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12: 159-167, 1993).

El vector de expresión (o el anticuerpo o fragmento del mismo expuesto en esta memoria) puede estar atrapado en un liposoma. Véase, p. ej., Ghosh y Bachhawat, en: *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, Wu G, Wu C ed., Nueva York: Marcel Dekker, pp.87-104 (1991); Radler et al., *Science*, 275(5301): 810-814, 1997). Se contemplan también en la descripción diversas estrategias comerciales que implican tecnología de "lipofección". El liposoma puede estar complejado con un virus hemaglutinante (HVJ). Se ha demostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y promueve la entrada en la célula de DNA encapsulado en liposomas (Kaneda et al., *Science*, 243: 375-378, 1989). El liposoma puede complejarse o emplearse en conjunción con proteínas cromosómicas nucleares distintas de histona (HMG-1) (Kato et al., *J. Biol. Chem.*, 266: 3361-3364, 1991). El liposoma puede estar complejado o emplearse en conjunción a la vez con HVJ y HMG-1. Tales constructos de expresión se han empleado con éxito en transferencia y expresión de ácido nucleico *in vitro* e *in vivo*. En algunas variaciones de la descripción, un resto de direccionamiento a la integrina alfa-2, tal como un anticuerpo o fragmento de la integrina alfa-2, se incluye en el liposoma para direccionar el liposoma a células (tales como células de cáncer)

que expresan integrina alfa-2 en su superficie.

La invención proporciona adicionalmente una célula que comprende el vector, p. ej., la célula se transforma o transfecta con un vector que comprende el polinucleótido. En ciertos aspectos de la descripción, la célula expresa un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-integrina alfa-2 que contiene una o más CDRs que tienen al menos 75% de identidad con las CDRs de Ab 770.8, Ab 778.17, o Ab 774.3. En diversos aspectos, la célula expresa un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-integrina alfa-2 que contiene la VH y la VL que comprenden CDRs idénticas a las de Ab 11q.8, Ab 778.17, o Ab 774.3. La célula puede ser una célula procariota, tal como *Escherichia coli* (véase, p. ej., Pluckthun et al., *Methods Enzymol.*, 178: 497-515, 1989), o una célula hospedadora eucariota, tal como una célula animal (p. ej., una célula de mieloma, célula de Ovario de Hámster Chino, o célula de hibridoma), levadura (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*), o una célula vegetal (p. ej., una célula de tabaco, maíz, soja, o arroz). Se espera que el uso de células hospedadoras de mamífero proporcione tales modificaciones de traducción (p. ej., glicosilación, truncación, lipidación, y fosforilación) que pueden ser deseables para conferir actividad biológica óptima en productos de expresión recombinantes. Análogamente, la invención abarca polipéptidos (p. ej., anticuerpos) que están glicosilados o no glicosilados y/o han sido modificados covalentemente para incluir una o más fijaciones de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, polioxietilenglicol, o polipropilenglicol.

Métodos para introducción de DNA en la célula hospedadora, que son bien conocidos y se practican rutinariamente en la técnica, incluyen transformación, transfección, electroporación, inyección nuclear, o fusión con portadores tales como liposomas, micelas, células fantasma, y protoplastos. Como se ha expuesto anteriormente, tales células hospedadoras son útiles para amplificar los polinucleótidos y también para expresar los polipéptidos de la descripción codificados por el polinucleótido. A este respecto, la descripción proporciona un proceso para la producción de un agente de fijación de la integrina alfa-2, que comprende cultivar la célula hospedadora descrita en esta memoria y aislar el agente de fijación de la integrina alfa-2. La transferencia en células de un constructo de expresión de DNA desnudo puede realizarse utilizando bombardeo de partículas, que depende de la capacidad para acelerar microproyectiles recubiertos de DNA a una velocidad alta que permite que los mismos atraviesen las membranas celulares y entren en las células sin destruirlas (Klein et al., *Nature*, 327: 70-73, 1987). Se han desarrollado varios dispositivos para aceleración de partículas pequeñas. Un dispositivo de este tipo está basado en una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, que proporciona a su vez la fuerza motora (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 87: 9568- 9572, 1990). Los microproyectiles utilizados han consistido en sustancias biológicamente inertes tales como perlas de wolframio u oro. La célula hospedadora puede aislarse y/o purificarse. La célula hospedadora puede ser también una célula transformada *in vivo* para causar la expresión transitoria o permanente del polipéptido *in vivo*. La célula hospedadora puede ser también una célula aislada transformada *ex vivo* e introducida después de la transformación, p. ej. para producir el polipéptido *in vivo* para propósitos terapéuticos. La definición de célula hospedadora excluye explícitamente un ser humano transgénico.

Métodos particulares para producción de anticuerpos a partir de polinucleótidos son generalmente bien conocidos y se utilizan rutinariamente. Por ejemplo, procedimientos básicos de biología molecular han sido descritos por Maniatis et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989 (véase también Maniatis et al., Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 2001). Adicionalmente, numerosas publicaciones describen técnicas adecuadas para la preparación de anticuerpos por manipulación de DNA, creación de vectores de expresión, y transformación y cultivo de células apropiadas (véase, p. ej., Mountain y Adair, Capítulo 1 en *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Tombs ed., Intercept, Andover, UK, 1992); y *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel ed., Wiley Interscience, Nueva York, 1999).

En un aspecto, la descripción proporciona un método de producción de un anticuerpo, comprendiendo el método (a) propagar células de cáncer en una matriz tridimensional (es decir, un gel tridimensional de cultivo de células); (b) inmunizar un mamífero con las células de cáncer propagadas; y (c) aislar un anticuerpo a partir del mamífero inmunizado. Los procesos celulares se modulan por las propiedades de composición y mecánicas de una matriz extracelular tridimensional circundante (ECM). Así, la matriz tridimensional comprende preferiblemente componentes que se encuentran típicamente en la matriz extracelular, p. ej. diversas combinaciones de colágeno, fibrina, elastina, proteoglicanos, y glicoproteínas estructurales. Puede utilizarse cualquier tipo de célula de cáncer capaz de proliferar en una matriz tridimensional *in vitro*. Opcionalmente, el método comprende además (d) ensayar el anticuerpo respecto a actividad anticáncer. Ejemplos de ensayos para evaluación de la actividad de un agente de fijación de la integrina alfa-2 en cuanto a actividad anticáncer (p. ej., la inhibición de la proliferación de las células de cáncer) incluyen, pero no se limitan a, ensayos ELISA y ensayos tridimensionales de proliferación de células. El método incluye opcionalmente la recogida de células de bazo a partir del animal inmunizado y la generación de un hibridoma que produce un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-integrina alfa-2. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

La descripción incluye adicionalmente un método de identificación de un agente que inhibe la proliferación de las células de cáncer. El método comprende realizar un ensayo de competición con un agente candidato y un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Ab 770.8, Ab 778.17, y Ab 774.3 o un fragmento de fijación a antígeno de cualquiera de los anteriores. El método comprende adicionalmente aislar un agente candidato que está bloqueado respecto a la fijación de un polipéptido de la integrina alfa-2 de SEQ ID NO: 25 (o porción del mismo) por Ab 770.8, Ab 778.17, Ab 774.3, o un fragmento de fijación a antígeno de cualquiera de los anteriores. Alternativa o adicionalmente, el método comprende aislar un agente candidato que bloquea la fijación de Ab 770.8, Ab 778.17, Ab

774.3, o un fragmento de fijación a antígeno de cualquiera de los anteriores a la integrina alfa-2. Cualquier agente candidato es adecuado para la selección en el contexto del método; en un aspecto, el agente es un anticuerpo o fragmento del mismo. El método es adecuado para selección de alta capacidad y permite la identificación más rápida y más económica de terapéuticos candidato comparada con las técnicas existentes. Además, el uso de una matriz tridimensional *in vitro* recapitula la función celular y el comportamiento *in vivo* de tal modo que las células de cáncer propagadas tienen mayor probabilidad de presentar antígenos que podrían presentarse *in vivo*, permitiendo el descubrimiento no sesgado de nuevas dianas de fármacos del cáncer.

Inhibición de la proliferación de las células de cáncer y tratamiento del cáncer

En diversas realizaciones de la descripción, el agente de fijación de la integrina alfa-2 inhibe la proliferación de las células de cáncer en cultivo de células tridimensional. Por ejemplo, en un aspecto, el agente de fijación de la integrina alfa-2 inhibe la proliferación de las células de cáncer en un cultivo de células tridimensional cuando el agente está presente a una concentración de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 500 nM (p. ej., aproximadamente 100 nM). Las células de cáncer incluyen, pero sin carácter limitante, células de cáncer de mama, células de cáncer de vejiga, células de melanoma, células de cáncer de próstata, células de mesotelioma, células de cáncer de pulmón, células de cáncer testicular, células de cáncer de tiroides, células de carcinoma de células escamosas, células de glioblastoma, células de neuroblastoma, células de cáncer uterino, células de cáncer colorrectal, y células de cáncer de páncreas.

La descripción incluye un método de inhibición de la proliferación de las células de cáncer. El método comprende poner en contacto las células de cáncer con una cantidad de un agente de fijación de la integrina alfa-2 (tal como un agente de fijación de la integrina alfa-2 descrito en esta memoria) eficaz para inhibir la proliferación de las células de cáncer. El método incluye poner en contacto las células de cáncer con un agente de fijación de la integrina alfa-2 (p. ej. un anticuerpo o fragmento del mismo) que compite por la fijación con Ab 770.8, Ab 778.17, o Ab 774.3 a la integrina alfa-2 humana y/o se fija a la región de la integrina alfa-2 reconocida por Ab 770.8, Ab 778.17, o Ab 774.3, e inhibe la proliferación de las células de cáncer. En algunos aspectos, las células de cáncer se encuentran en un individuo, y el contacto comprende la administración del agente de fijación de la integrina alfa-2 al individuo. Se entenderá que el polinucleótido, vector, y célula de la descripción pueden utilizarse en métodos de inhibición de la proliferación de las células de cáncer *in vitro* e *in vivo* (p. ej., en un método de tratamiento del cáncer en un individuo).

Se proporciona también un método de modulación del crecimiento de un tumor en un individuo. El método comprende administrar al individuo una composición que comprende un agente de fijación de la integrina alfa-2 en una cantidad eficaz para modular el crecimiento del tumor en el individuo. "Tumor" se refiere a cualquier crecimiento o proliferación de células neoplásicas, sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular incontrolado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos de cánceres incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón microcítico o cáncer de pulmón no microcítico), melanoma, mesotelioma, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, meduloblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer de esófago, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. "Cáncer metastásico" es un cáncer que tiene el potencial de, o ha comenzado a extenderse en otras áreas del cuerpo. Una diversidad de cánceres pueden producir metástasis, pero los cánceres metastásicos más comunes son de mama, de pulmón, renal, mieloma múltiple, de tiroides y de próstata. A modo de ejemplo, otros cánceres que tienen el potencial de producir metástasis incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinoma; enfermedades malignas de las células de la sangre, con inclusión de leucemia y linfoma; cánceres de cabeza y cuello; cánceres gastrointestinales, con inclusión de cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer intestinal, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer del conducto biliar o cáncer de vesícula; enfermedades malignas del tracto genital femenino, con inclusión de carcinoma de ovario, cánceres endometriales uterinos, cáncer vaginal, y cáncer cervical; cáncer de vejiga; cáncer testicular; cáncer de cerebro, con inclusión de neuroblastoma y glioma; sarcoma; osteosarcoma, y cáncer de piel, con inclusión de melanoma maligno y cáncer de células escamosas. La descripción incluye un método de tratamiento del cáncer por administración de un agente de fijación de la integrina alfa-2 a un individuo que se encuentra en necesidad de ello.

La "Inhibición" de la proliferación de las células de cáncer no requiere un 100% de prevención de la proliferación. Se contempla cualquier reducción en la velocidad de proliferación. Análogamente, "modulación" del crecimiento del tumor se refiere a reducción del tamaño del tumor, ralentización del crecimiento del tumor, o inhibición de un aumento en el tamaño de un tumor existente. No se requiere la supresión completa de un tumor; cualquier disminución en el tamaño de un tumor o ralentización del crecimiento del tumor constituye un efecto biológico beneficioso en un individuo. A este respecto, la reducción disminuye la proliferación de las células de cáncer en, p. ej., al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 20% comparada con los niveles de proliferación observados en ausencia del método de inventiva (p. ej., en un individuo de control o espécimen biológicamente equiparable que no se expone al agente del método de inventiva). El efecto se detecta, por ejemplo, por una disminución en el tamaño del tumor, una disminución o mantenimiento de los niveles de marcadores de cáncer, o reducción o mantenimiento de una población de células de cáncer. En algunos aspectos, la proliferación se reduce en

al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60%. En algunos aspectos, el método inhibe la proliferación en al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o más (aproximadamente 100%) comparada con la proliferación en ausencia del agente del método.

5 Adicionalmente, los agentes de fijación de la integrina alfa-2 pueden utilizarse para aliviar o reducir los efectos secundarios asociados con el cáncer tales como, por ejemplo, deterioro óseo, colapso vertebral, y parálisis. En un aspecto, el individuo sufre o se encuentra en riesgo de sufrir metástasis óseas y el agente de fijación de la integrina alfa-2 se administra en una cantidad tal que reduzca el deterioro del hueso circundante. De acuerdo con ello, en algunos aspectos, el agente de fijación de la integrina alfa-2 previene el deterioro de los huesos debido a metástasis
10 ósea, pero no reduce la proliferación de las células de cáncer. Sin embargo, en otros aspectos, el agente de fijación de la integrina alfa-2 previene a la vez el deterioro óseo debido a metástasis óseas y reduce la proliferación de las células de cáncer. En general, el efecto sobre la proliferación de las células de cáncer (es decir, la inhibición de la proliferación o la ausencia de efecto sobre la proliferación) depende del microentorno de una metástasis particular. Sin desear quedar ligados por ninguna teoría particular, se inhibe la proliferación de las metástasis localizadas en
15 microentornos con cantidades sustanciales de colágeno tipo 1. En contraste, la proliferación de las metástasis localizadas en microentornos que carecen de cantidades sustanciales de colágeno tipo 1 puede no inhibirse, pero el deterioro de los huesos en la proximidad de la metástasis se reduce o se previene.

Inhibición de la angiogénesis

20 Se proporciona también un método de inhibición de la angiogénesis en un individuo. El método comprende administrar al individuo una composición que comprende un agente de fijación de la integrina alfa-2 en una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis en el individuo.

La angiogénesis juega un papel importante en la formación y el crecimiento de los tumores. El desarrollo de un sistema de vasos sanguíneos para suministrar nutrientes al tumor en desarrollo es crítico para la tumorigénesis. La angiogénesis de un tumor implica la proliferación y migración incrementada de células endoteliales; y la formación de
25 tubos en la masa del tumor. Durante la angiogénesis, las células endoteliales se activan, degradan la membrana basal local, y el bazo comienza a "brotar" con células migrantes punta que lideran una columna de células tallo proliferantes. Estos brotes de vasos sanguíneos forman eventualmente canales y se desarrollan en una red. Los vasos formados nuevamente se estabilizan por la síntesis de una nueva membrana basal y el reclutamiento de células de soporte tales como pericitos y células vasculares de musculatura lisa. Estos pasos angiogénicos implican cambios en la adhesión
30 de endotelio o pericitos. La angiogénesis anormal está asociada también con una miríada de otras enfermedades o trastornos, que incluyen enfermedad neovascular ocular, artritis, hemangiomas, y trastornos de la piel, tales como psoriasis. Las integrinas juegan cierto papel en la angiogénesis.

El término "angiogénesis" se refiere a todos los procesos que contribuyen al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, en particular, pero sin limitarse a nuevos vasos sanguíneos suministradores del tumor.
35 Estos procesos incluyen eventos celulares múltiples tales como proliferación, supervivencia, migración y brotación de células vasculares endoteliales, atracción y migración de pericitos, así como formación de membrana basal para estabilización de los vasos, perfusión de los vasos, o secreción de factores angiogénicos por células estromales o neoplásicas.

La "inhibición" de la angiogénesis no requiere un 100% de prevención de la angiogénesis. Se contempla cualquier
40 reducción en la tasa de angiogénesis. Cualquier disminución en la angiogénesis constituye un efecto biológico beneficioso en un individuo. A este respecto, la reducción reduce la angiogénesis en, p. ej., al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 20% comparada con los niveles de angiogénesis observados en ausencia del método (p. ej., en un individuo o espécimen de control biológicamente equiparable que no está expuesto al agente del método). El efecto se detecta, por ejemplo, por una disminución en la formación de
45 vasos sanguíneos, una reducción en el tamaño del tumor, una disminución o mantenimiento de los niveles de marcadores de cáncer, o reducción o mantenimiento de una población de células de cáncer. Puede utilizarse cualquier modelo de angiogénesis animal adecuado, incluyendo, pero no se limitan a un modelo de neovascularización de oreja de ratón o conejo (Frank et al. 1994. *Microsurgery*, 15(6): 399-404), un modelo animal de artritis reumatoide (Haas et al. 2007, *Arthritis Rheum.*, 5(5(8): 2535-48), o un modelo de cáncer *in vivo*, tal como un modelo de metástasis de
50 melanoma de ratón (Lee et al. 2006. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 57(6): 761-71) o un modelo canino de cáncer de vejiga urinaria humana invasivo (Mohammed et al. 2003. *Mol. Cancer Ther.*, 2(2): 183-188). Las imágenes Doppler y las imágenes de resonancia magnética detectan flujo de sangre o cambios de vascularización en tejidos (véase, p. ej. Taylor. 2002, *Arthritis Res.*, 4 (suplem. 3): S99-S107), y el examen microscópico de biopsias tisulares detecta cambios en el número o calidad de los vasos. La tomografía computerizada de perfusión ("perfusion CT") (Miles et al. 1998. *Brit. J Radiol*, 71: 276-281) y las imágenes de resonancia magnética (MRI) mejorada por contraste dinámico (Hathout et al. 2007. *Transpl. Int.*, 20(12): 1059-1065) son también eficaces para evaluar la neovascularización. La neovascularización ocular puede detectarse utilizando angiografía con fluoresceína, imágenes Doppler en color, y por examen clínico. La angiogénesis puede reducirse en al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente
55 40 %, al menos aproximadamente 50 %, o al menos aproximadamente 60%. El método puede inhibir la angiogénesis en al menos 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o más (aproximadamente 100%) comparada con la angiogénesis en ausencia del agente de fijación de la integrina alfa-2.
60

Inhibición de la fibrosis

Se proporciona también un método de tratamiento de un trastorno fibrótico en un individuo. El método comprende administrar al individuo una composición que comprende un agente de fijación de la integrina alfa-2 en una cantidad eficaz para tratar el trastorno fibrótico en el individuo.

- 5 El proceso de reparación tisular como parte de la curación de las heridas implica dos fases. La primera fase es la fase regenerativa, en la cual las células lesionadas son reemplazadas por células del mismo tipo. La segunda fase es la formación de tejidos fibrosos, llamada también fibroplasia o fibrosis, en la cual los tejidos parenquimáticos normales son reemplazados por tejido conectivo. El proceso de reparación tisular puede llegar a ser patógeno si la fase de fibrosis continúa descontrolada, conduciendo a una remodelación extensa del tejido y la formación de tejido de escara permanente. Trastornos orgánicos fibróticos mayores incluyen enfermedad intersticial pulmonar (ILD) (caracterizada por inflamación y fibrosis pulmonar), cirrosis hepática, fibrosis hepática resultante de infección crónica por hepatitis B o C, enfermedad renal, enfermedad cardíaca, y enfermedades oftálmicas (con inclusión de degeneración macular y retinopatía retinal y vítrea). Trastornos fibroproliferativos incluyen también escleroderma sistémico y local, queloides y escaras hipertróficas, aterosclerosis, y restenosis. Enfermedades fibroproliferativas adicionales incluyen formación excesiva de escaras resultante de cirugía, fibrosis inducida por fármacos quimioterapéuticos, fibrosis inducida por radiación, y lesiones y quemaduras. Se ha demostrado que la integrina alfa-2 juega un papel en la fibrosis por interacciones con colágeno tipo I.

- En algunos aspectos, el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, fibrosis pulmonar, esclerosis sistémica, fibrosis de trasplante de órganos, fibrosis endomiocárdica, fibrosis del mediastino, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, Enfermedad de Crohn, y artrofibrosis. En aspectos específicos, la fibrosis del pulmón es fibrosis pulmonar idiopática. En otros aspectos, la enfermedad hepática crónica se selecciona del grupo que consiste en hepatitis C, cirrosis, NAFLD, NASH, y colangitis esclerosante primaria.

- El "tratamiento" de un trastorno fibrótico no requiere un 100% de prevención de la fibrosis. Se contempla cualquier reducción en la tasa de fibrosis. Cualquier inhibición de la fibrosis, disminución de la fibrosis, o reducción en la tasa de generación de tejido fibrótico constituye un efecto biológico beneficioso en un individuo. A este respecto, la reducción disminuye la fibrosis, por ejemplo, en al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 20% comparada con los niveles de fibrosis observados en ausencia del método (p. ej., en un individuo o espécimen de control biológicamente equiparable que no se expone al agente del método inventivo). La fibrosis puede reducirse en al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60%. El método puede inhibir la fibrosis en al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o más (aproximadamente 100%) comparada con la fibrosis en ausencia del agente del método. El efecto se detecta, por ejemplo, por una disminución en tejido de escara o tejido fibroso. El efecto puede detectarse también por mejora de los síntomas asociada con un trastorno fibrótico particular. Por ejemplo, el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática puede monitorizarse por medida de los cambios en el volumen pulmonar.

Consideraciones de administración

- Un régimen de administración particular para un individuo particular dependerá, en parte, del agente utilizado, la cantidad de agente administrada, la ruta de administración, y la causa y extensión de cualesquiera efectos secundarios. La cantidad de agente administrada a un individuo (p. ej. un mamífero, tal como un humano) debería ser suficiente para producir la respuesta deseada en un marco de tiempo razonable. En diversos aspectos, el método comprende administrar, p. ej., desde aproximadamente 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg o más. En otros aspectos, la dosificación oscila desde aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg ; o aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg ; o aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg ; o aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg ; o aproximadamente 2 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg ; o aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg ; o aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg ; o aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg ; o aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg ; o aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg . Algunas afecciones o estados de enfermedad requieren tratamiento prolongado, que puede implicar o no la administración de dosis de agente de fijación de la integrina alfa-2 a lo largo de administraciones múltiples (p. ej., cada día, tres veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, o una vez al mes durante un tratamiento prolongado de tres días, siete días, dos semanas, tres semanas, un mes, tres meses, seis meses, nueve meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, 21 meses, dos años, o más).

- Métodos adecuados de administración de una composición fisiológicamente aceptable, tal como una composición farmacéutica que comprende el agente de fijación de la integrina alfa-2, son bien conocidos en la técnica. Aunque puede utilizarse más de una ruta para administrar un agente, una ruta particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra ruta. Dependiendo de las circunstancias, una composición farmacéutica que comprende el agente de fijación de la integrina alfa-2 se aplica o se instila en cavidades corporales, se absorbe a través de la piel o membranas mucosas, se ingiere, se inhala, y/o se introduce en la circulación. Por ejemplo, en ciertas circunstancias, será deseable suministrar una composición farmacéutica que comprende el agente por vía oral,

mediante inyección por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimática), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, intralesional, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, uretral, vaginal, o rectal, por sistemas de liberación sostenida, o por dispositivos de implantación. Si se desea, el agente se administra regionalmente por administración intraarterial o intravenosa que alimenta la región de interés, p. ej., por la vía de la arteria hepática para suministro al hígado. Como alternativa, la composición se administra localmente por vía de implantación de una membrana, esponja, u otro material apropiado en el cual se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. En el caso de que se utilice un dispositivo de implantación, el dispositivo, en un aspecto, se implanta en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro de la molécula deseada tiene lugar, por ejemplo, por difusión, bolus de liberación controlada, o administración continua. En otros aspectos, el agente se administra directamente al tejido expuesto durante la resección del tumor u otros procedimientos quirúrgicos. Estrategias terapéuticas de suministro son bien conocidas por el técnico experimentado, describiéndose adicionalmente algunas de ellas, por ejemplo, en la Patente U. S. No.5.399.363.

La invención incluye una composición, tal como una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo de la integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo y un portador (es decir, vehículo, adyuvante, o diluyente). El portador particular empleado está limitado únicamente por consideraciones químico-físicas, tales como solubilidad y carencia de reactividad con el agente de fijación o co-terapia, y por la ruta de administración. Portadores fisiológicamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Formas farmacéuticas ilustrativas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (por ejemplo, véase la Patente U. S. No.5.466.468). Formulaciones inyectables se describen adicionalmente en, p. ej., *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Co., Philadelphia. Pa., Banker y Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982), y en *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, cuarta edición, páginas 622-630 (1986)). Una composición farmacéutica que comprende el agente de fijación de la integrina alfa-2 se dispone, en un aspecto, en envases, junto con un material de empaquetado que proporciona instrucciones relativas al uso de tales composiciones farmacéuticas. Generalmente, tales instrucciones incluyen una expresión tangible que describe la concentración del reactivo, así como, en ciertas realizaciones, las cantidades relativas de ingredientes excipientes o diluyentes (p. ej., agua, solución salina o PBS) que pueden ser necesarias para reconstituir la composición farmacéutica.

En diversos aspectos, el método comprende adicionalmente administrar un agente antineoplásico, que puede estar presente en la composición que comprende un agente de fijación de la integrina alfa-2 o proporcionado en una composición separada utilizando la misma ruta de administración o una ruta diferente. Agentes terapéuticos antineoplásicos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antibióticos, inhibidores de folato, análogos de purina, análogos de pirimidina, y compuestos radiosensibilizadores. Agentes terapéuticos antineoplásicos específicos incluyen ilustrativamente acivicina, aclarrubicina, acodazol, acronina, adozelesina, aldesleucina, alitretinoína, alopurinol, altretamina, ambomicina, ametantrona, amifostina, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, antramicina, trióxido de arsénico, asparaginasa, asperlín, azacitidina, azetepa, azotomicina, batimastat, benzodepa, bicalutamida, bisantreno, bisnafide dimesilato, bizelesina, bleomicina, brequinar, bropirimina, busulfán, cactinomicina, calusterona, capecitabina, caracemida, carbetimer, carboplatino, carmustina, carrubicina, carzelesina, cedefingol, celecoxib, clorambucil, clolemicina, cisplatino, cladribina, crisanol mesilato, ciclofosfamida, citarabina, dacarbacina, dactinomicina, daunorrubicina, decitabina, desormaplatino, dezaguanina, dezaguanina mesilato, diaziquona, docetaxel, doxorubicina, droloxifeno, droloxifeno, dromostanolona, duazomicina, edatrexato, eflomitina, elsamitrucina, enloplatino, enpromato, epiropidina, epirubicina, erbulozol, esorubicina, estramustina, estramustina, etanidazol, etoposido, etoposido, etoprina, fadrozol, fazarabina, fenretinida, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flurocitabina, fosquidona, fostriecina, fulvestrant, gemcitabina, gemcitabina, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, ilmofosina, interleucina II (IL-2, con inclusión de interleucina II recombinante o rIL2), interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-n1, interferón alfa-n3, interferón beta-1a, interferón gamma-1 b, iproplatin, irinotecán, lenoreotida, letrozol, leuprolida, liarozol, lometrexol, lomustina, losoxantrona, masoprocol, maytansina, mecloretamina hidrocloreto, megestrol, melengestrol acetato, melfalán, menogaril, mercaptopurina, metotrexato, metoprina, metureda, mitindomina, mitocarcina, mitocromina, mitogilina, mitomalcina, mitomicina, nitosper, mitotano, mitoxantrona, ácido micofenólico, nelarabina, nocodazol, nogalamicina, ormaplatino, oxisurán, paclitaxel, pegaspargasa, peliomicina, pentamustina, peplomicina, perfosfamida, pipobromán, pipsulfán, piroxantrona hidrocloreto, plicamicina, plomestano, porfimer, porfomicina, prednimustina, procarbazona, puomicina, pirazofurina, riboprina, roglitimida, safingol, safingol, semustina, simtrazeno, sparfosato, sparsomicina, espirogermanio, espiromustina, espiroplatin, estreptonigrina, estreptozocina, sulofenur, talisomicina, tamoxifeno, tecogalán, tegafur, teloxantrona, temporina, teniposido, teroxirona, testolactona, tiampirina, tioguanina, tiotepa, tiazofurina, tirapazamina, topotecán, toremifeno, trestolona, tricilbina, trietilenomelamina, trimetrexato, triptorelina, tubulozol, mostaza de uracilo, uredepa, vapreotida, verteporlina, vinblastina, vincristina sulfato, vindesina, vinepidina, vinglicinato, vinleurosina, vinorelbina, vinrosidina, vinzolidina, vorozol, zeniplatino, zinostatina, zoledronato, y zorrubicina. Estos y otros agentes terapéuticos antineoplásicos se describen, por ejemplo, en Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill Professional, 10ª edición 2001.

Otros agentes terapéuticos adicionales ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides; inhibidores de caliceína; corticosteroides (p. ej., prednisona, metilprednisolona, dexametasona, o triamcinolona-azetidínida); agentes anti-inflamatorios (tales como compuestos anti-inflamatorios no corticosteroides (p. ej., ibuprofeno o flubiprofeno));

5 vitaminas y minerales (p. ej., cinc); y antioxidantes (p. ej., carotenoides (tales como carotenoide de xantofila tal como zeaxantina o luteína)). Proteínas neutralizantes de factores de crecimiento, tales como un anticuerpo monoclonal que es específico para un factor de crecimiento dado, p. ej., VEGF (por ejemplo, véase Aiello et al., *PNAS USA*, 92: 10457-10461 (1995)), o fosfotirosina (Dhar et al., *Mol. Pharmacol.*, 37: 519-525 (1990)), son adecuadas para co-administración o incorporación en una composición, en caso deseado. Otros compuestos terapéuticos adicionales diversos incluyen moduladores de citocinas, un inhibidor específico de la proliferación de células endoteliales (p. ej., trombospondina), un péptido antiproliferativo (p. ej., SPARC y péptidos semejantes a proliferina), aminoguanidina, un inhibidor de la enzima convertidora de las angiotensinas (p. ej., angiotensina II), un inhibidor de la angiogénesis, aspirina, y ácido retinoico y análogos del mismo. El agente terapéutico adicional puede ser una sal, éster, amida, hidrato, y/o profármaco farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos u otros agentes terapéuticos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo describe un método ilustrativo de generación de anticuerpos para las proteínas de la superficie celular (p. ej., anticuerpos anti-integrina alfa-2).

15 Se prepararon inmunógenos por imbibición de células tumorales en colágeno tipo I. El colágeno tipo I se preparó a partir de tendones de cola de rata o ratón y se disolvió en ácido acético al 0,2% a una concentración de 2,7 mg/ml. Para inducir la gelificación, la solución de colágeno se mezcló con 10X MEM y NaOH 0,34N a una ratio de 8:1:1 a 4°C. Se suspendieron células MDA-MB-231 (1-5 x 10⁶) en 1 ml de la mezcla, y se sembraron luego en placas de 12 pocillos. Las placas se incubaron a 37°C para completar la gelificación, y se añadió luego el medio de cultivo encima del gel. Después de cuatro días de incubación, se cosecharon las células por eliminación de la capa superior del medio y se transfirió el gel de colágeno a un tubo de centrifuga de 15 ml. Se lavó el gel con PBS, y se disolvió luego por adición de 1 ml de PBS de Dulbecco que contenía colagenasa tipo 3 e incubación a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en PBS para inmunización en ratones hembra Balb/c de seis semanas de edad.

20 El protocolo de inmunización siguió típicamente a una inyección inicial intraperitoneal, seguida por refuerzos a intervalos de 2 ó 3 semanas. Una vez que los títulos de suero fueron aceptables, se administró un refuerzo final y los animales se sacrificaron cuatro días más tarde. Se extirparon los bazo y se realizó una hibridación estándar de las células somáticas con el mieloma de ratón P3X63-Ag8.653 como pareja de fusión.

25 Los sobrenadantes de los clones de hibridoma se ensayaron en un formato ELISA de células enteras. Resumidamente, las células utilizadas en el protocolo de inmunización descrito anteriormente (p. ej., MDA-MB-231) se cosecharon por raspado mecánico de las placas de cultivo de células, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en PBS que contenía 1% de seroalbúmina bovina (PBS/BSA) a 10⁶ células/ml. Se añadieron 100 µl de la suspensión de células (10⁵ células/pocillo) a los pocillos de placas de PVC de 96 pocillos con fondo en V (Corning) y se redujeron a pelets por centrifugación a 200 g durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante por aspiración o por secado con papel secante de las placas invertidas sobre toallitas de papel. Los pelets de células resultantes se resuspendieron en 50 µl del medio sobrenadante de los cultivos de hibridoma y se incubaron durante una hora a 4°C. Las placas se centrifugaron luego y las células se lavaron dos veces con 100 µl de PPS/BSA. Se resuspendieron después las células en 50 µl de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) dirigido contra las inmunoglobulinas de ratón a la dilución recomendada por los fabricantes y se incubaron durante una hora adicional a 4°C. Las células se lavaron luego 3 veces con 100 µl de PBS y se detectó la actividad de HRP por resuspensión de las células en 50 µl de sustrato TMB (Thermo Scientific), seguido por monitorización de la absorbancia a 450 nm después de la adición de ácido sulfúrico.

30 Las células de los pocillos activos se subclonaron por dilución limitante y se ensayaron de nuevo respecto a actividad para asegurar que los cultivos eran monoclonales. Se utilizaron luego los hibridomas activos para generar fluido de ascitis por inyección en cavidades peritoneales de ratón. El fluido de ascitis resultante se aclaró de células y residuos por centrifugación a 10.000 g y se utilizó como tal, o se purificó ulteriormente mediante Resina de Purificación Melon Gel (Thermo Scientific).

Ejemplo 2

Este ejemplo describe un ensayo ilustrativo para evaluación de la actividad anticáncer de un agente de fijación de la integrina alfa-2. Como se describe adicionalmente más adelante, Ab 770.8, Ab 774.3 and Ab 778.17 modulan la forma celular e inhiben la proliferación de las células de cáncer que crecen en gel tridimensional de cultivo de colágeno.

35 La capacidad de un agente de fijación de la integrina alfa-2, Ab770.8, para inhibir la proliferación celular se determinó en cultivo bi- y tridimensional utilizando un hemocitómetro. Para el cultivo bidimensional, se extendieron en placas células de cáncer de mama MDA-MB-431 a razón de 10.000 células por pocillo (1 ml/ pocillo) en placas de cultivo de 24 pocillos utilizando medio estándar de crecimiento o medio suplementado con fluido de ascitis de Ab 770.8. En diversos momentos, se desprendieron las células del sustrato de plástico por tratamiento con tripsina y se enumeraron mediante un hemocitómetro.

Para la evaluación de la proliferación celular en geles de colágeno tridimensionales, se embebieron las células MDA-

MB- 431 en colágeno tipo I (10^5 células/ml) y se extendieron en placas de 24 pocillos a 0,5 ml/pocillo. Después de gelificación a 37°C durante 45 min, se añadieron a cada pocillo 0,5 ml de medio de cultivo con o sin adición de fluido de ascitis de Ab 770.8. En diversos momentos, se cosecharon las células por eliminación de la capa superior de medio y se transfirió el gel de colágeno a un tubo de centrífuga de 15 ml. El gel se lavó con PBS, y se disolvió luego por adición de 1 ml de PBS de Dulbecco que contenía 1 mg/ml de colagenasa tipo 3 (Worthington) e incubación a 37°C. Después de la disolución del gel, se redujeron las células a un sedimento, se resuspendieron en PBS y se enumeraron mediante un hemocitómetro.

Las células en cultivo bi- o tridimensional en ausencia de fluido de ascitis de Ab 770.8 exhibían crecimiento rápido, duplicándose al cabo de cuatro días. Ab 770.8 no tenía efecto alguno sobre el crecimiento celular en condiciones estándar de cultivo bidimensional. Notablemente, a pesar de tener efectos insignificantes en cultivo bidimensional, Ab 770.8 impedía el aumento del número de células en las matrices de colágeno tridimensionales. Se obtuvieron los mismos resultados utilizando Ab 770.8 purificado.

La forma celular y la proliferación en cultivo tridimensional se evaluó también visualmente. Se preparó colágeno tipo I a partir de tendones de cola de rata y se disolvió en ácido acético al 0,2% a 2,7 mg/ml. Para inducir la gelificación, se mezcló colágeno con 10X MEM y NaOH 0,34N a una ratio de 8:1:1 a 4°C. Se resuspendieron células MDA-MB-231 a ~700.000 células/ml en esta mezcla y se extendieron en placas de cultivo de 96 pocillos a 75 µl/pocillo (obteniéndose ~50.000 células/pocillo). Después de gelificación durante 45 min a 37°C, se añadieron sobre el gel 75 µl de medio de cultivo (típicamente DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal) que contenían diversas diluciones de medio de cultivo de ascitis de Ab 770.8 (1:100, 1:300, 1:1000, 1:3000, y 1:10.000), Ab 774.3 (diluciones de 1:100 y 1:500), Ab 778.17 (diluciones de 1:100 y 1:500) con fluido de ascitis inactivo, o medio de cultivo sólo. Las células MDA-MB-231 se incubaron a 37°C en una cámara humidificada con 5% de CO₂.

Se tomaron fotomicrografías de los pocillos utilizando un microscopio invertido estándar de contraste de fase provisto de una cámara digital para evaluar el fenotipo celular y la proliferación. Después de dos días de cultivo, células sin tratar y células tratadas con ascitis inactiva se extendieron y habían comenzado a proliferar e invadir la matriz de colágeno circundante. En contraste, las células tratadas con Ab 770.8, Ab 774.3 y Ab 778.17 se mantenían esféricas, no invasivas, y no proliferativas a todas las diluciones ensayadas.

Adicionalmente, se evaluó la actividad anticáncer de los agentes de fijación de la integrina alfa-2, Ab 770.8, Ab 774.3 y Ab 778.17 contra células de glioblastoma humano primario (GBM). Las células GBM se mantuvieron en medio DMEM/F12 suplementado con B-27 (Invitrogen), 4 µg/ml heparina, y 20 ng/ml bFGF y EGF in matraces de cultivo de tejidos Corning Ultra-Low Attachment. En estas condiciones, las células GBM crecen típicamente como esferas tumorales. Para el paso, las esferas tumorales se disociaron en células simples por 10 pasos a través de una aguja hipodérmica de calibre 23, seguido por dilución en medio DMEM/F12 suplementado.

Aproximadamente 1000 esferas tumorales GBM se embebieron en geles de colágeno tipo I en placas de 24 pocillos (0,5 µl de gel de colágeno/pocillo). Después de gelificación a 37°C durante 45 min, se añadieron 0,5 ml de medio de crecimiento (suplementado con 40 ng/ml bFGF y EGF) o medio de crecimiento que contenía una dilución 1:1000 de Ab 770.8, Ab 774.3 y Ab 778.17. Se tomaron fotomicrografías en varios momentos subsiguientes a la siembra. Las células exhibían inicialmente una forma esférica después de la siembra. Después de cuatro horas en cultivo, las células se propagaban visiblemente a partir del esferoide inicial asumiendo una morfología alargada y estirada, e invadían la matriz de colágeno. En contraste, las células cultivadas en presencia de Ab 770.8, Ab 774.3 o Ab 778.17 retenían una forma esferoidal y no invadían la matriz de colágeno circundante.

Los resultados arriba descritos demuestran que los agentes de fijación de la integrina alfa-2 de la invención (p. ej., Ab 770.8, Ab 774.3 y Ab 778.17) inhiben la proliferación de tipos múltiples de células de cáncer en estructura tridimensional.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe un ensayo ilustrativo para evaluación de la actividad anticáncer de un agente de fijación de la integrina alfa-2. Como se detalla más adelante, un agente de fijación de la integrina alfa-2 de la invención inhibe la proliferación de las células de cáncer e inhibe la formación de sitios metastásicos en un modelo *in vivo* clínicamente relevante.

El modelo de xenoinjerto embrionario de pollo recapitula fielmente el comportamiento metastásico de las células de cáncer en modelos de xenoinjerto de ratón. Conn et al., *Am. J. Pathol.* 175, 1638 (2009); Ota et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 20318 (2009). Se inyectaron células de cáncer de mama MDA-MB-231 que expresaban la proteína roja fluorescente RFP (100 µl que contenían 150.000 células) en la vena alantoica de embriones de pollo inmunocompetentes de 11 días de edad. Se introdujo Ab 770.8 (como ascitis) con las células o se añadió 24 horas después de la inyección de las células. Después de seis días de incubación, se etiquetaron las paredes del vaso por inyección de isolectina B 4 etiquetada fluorescente verde para identificar las células endoteliales. Una hora más tarde, se sacrificaron los embriones y se evaluaron por microscopía fluorescente las cantidades totales de tejido tomadas distalmente del sitio de inyección.

En el interior de los tejidos de pollo, los vasos sanguíneos están rodeados por una capa densa de colágeno tipo I.

Después de la inoculación de las células de cáncer, las células tumorales se extravasaban de la vasculatura del pollo, invadían el entorno extracelular circundante rico en colágeno tipo I y formaban tumores nacientes durante el periodo de cultivo de seis días. Ab 770.8 inhibía notablemente la capacidad de las células MDA-MB-231 para formar sitios metastásicos en el interior de la matriz extracelular circundante. Se obtuvieron resultados análogos, si no idénticos, cuando el tratamiento con Ab 770.8 se demoró durante 24 horas después de la inoculación de las células de cáncer para permitir que la extravasación progresara hasta completarse. Tanto Ab 774.3 como Ab 778.17 exhibían la misma actividad que Ab 770.8 en experimentos separados.

El modelo descrito en el ejemplo es un medio cómodo para estudiar la invasión y metástasis de las células de cáncer, proporcionando al mismo tiempo una estrategia rápida para evaluar la capacidad de terapéuticas potenciales para inhibir estos procesos críticos. Los agentes de fijación de la integrina alfa-2, Ab 770.8, Ab 774.3 y Ab 778.17, ejercen una actividad post-extravasación antimetastásica potente *in vivo*.

Ejemplo 4

Este ejemplo describe un ensayo ilustrativo adicional *in vivo* para evaluación de la actividad anticáncer de un agente de fijación de la integrina alfa-2. Como se detalla más adelante, un agente de fijación de la integrina alfa-2 de la invención bloquea la expansión del tumor en entornos ricos en colágeno *in vitro* e *in vivo* al mismo tiempo que exhibe efectos inhibidores sobre las metástasis óseas y sus secuelas.

Para explorar adicionalmente la actividad *in vivo*, se utilizó un modelo de metástasis ósea de ratón en el cual se inyectan células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 en el ventrículo izquierdo cardiaco. Las células introducidas de esta manera tienden a formar metástasis en la extremidad posterior y la mandíbula (Canon et al., 2010; Canon et al., 2008). Después de la confirmación del suministro intracardiaco exitoso, se trataron ratones con dos dosis por semana de 10 mg/kg de Ab 770.8 durante 3 semanas ("periodo de tratamiento") y se monitorizó la progresión del tumor por obtención de imágenes luminiscentes. Al final de la prueba con el anticuerpo durante tres semanas, los ratones se mantuvieron otras dos semanas sin tratamiento adicional alguno con mAb ("periodo sin tratamiento").

El tratamiento con Ab 770.8 no tenía efecto alguno sobre la progresión del tumor en la extremidad posterior, pero demostraba un efecto de parálisis en la extremidad posterior, una manifestación común de deterioro del nervio espinal secundaria a colapso vertebral (Canon et al., *Bone* 46, 1613-1619 (2010); Canon et al., *Clin Exp Metastasis* 25, 119-129 (2008)). Durante el curso del experimento, fue necesario sacrificar por eutanasia el 30% de los animales de control al principio de la semana 4 (es decir, 5 de 15 ratones), sacrificándose 40% durante la semana 5 debido a parálisis del miembro posterior. En contraste, ninguno de los ratones tratados con Ab 770.8 presentaba parálisis durante el periodo de tratamiento de 3 semanas y únicamente 1 (de 10) animales tratados con Ab 770.8 exhibía parálisis del miembro posterior durante el período de 2 semanas "sin tratamiento". En contraste con el efecto observado en el fémur, la proliferación de MDA-MB-231 se reprimía notablemente en el compartimiento mandibular restringido en espacio. Estos residuos demuestran que Ab 770.8 bloquea la expansión del tumor en los entornos ricos en colágeno *in vitro* e *in vivo*, en tanto que exhibe efectos inhibidores sobre las metástasis óseas y sus secuelas.

Los datos proporcionados en esta memoria ilustran el impacto de un agente de fijación de la integrina alfa-2 (Ab 770.8) sobre el comportamiento del carcinoma de mama *in vivo*. Sin embargo, virtualmente todos los tipos de células de carcinoma expresan la integrina $\alpha\beta 1$ después de la invasión en tejidos circundantes (p. ej., ovario, páncreas, próstata, colon), respaldando un papel más global para los agentes de fijación de la integrina alfa-2 como terapéuticos del cáncer (Grzesiak et al., 2007; Kirkland, 2009; Shield et al., 2007; Van Slambrouck et al., 2009; Yoshimura et al., 2009).

Ejemplo 5

Este ejemplo describe un ensayo para la caracterización de la fijación de epítomos por los agentes de fijación de la integrina alfa-2. Como se detalla más adelante, Ab 770.8, Ab 774.3, y Ab 778.17 se fijan a los epítomos en el dominio I de la integrina alfa-2 en la unión de la hoja beta βC y βF dentro del dominio I de la integrina alfa-2.

El mapeado de epítomos se realizó por incubación de muestras de anticuerpos monoclonales (mAb) con una microrred de péptidos, seguido por incubación con un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente. Después del lavado, la microrred se escaneó en un sistema de escaneo de alta resolución. La microrred de péptidos consistía en un conjunto de péptidos 15-meros que estaban solapados por 10 residuos tomados de la subunidad de la integrina alfa-2 humana (número de acceso en Genbank AAM 34.795.1; se utilizaron los residuos de aminoácido 1-1133). Las redes de péptidos, incubaciones de anticuerpos, el escaneo y el análisis de los datos fueron generados por Prolimmune Inc, 4281 Express Lane, Suite L2378, Sarasota, FL 34238.

Los péptidos que comprendían la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 (YANNPRVFNLTNYK) y SEQ ID NO: 33 (AIASIPTEYFFNVS) eran reconocidos por Ab 770.8, Ab 774.3, y Ab 778.17. Estos péptidos mapean al dominio I de la integrina alfa-2 y comprenden adicionalmente la unión de la hoja beta βC y βF dentro de la estructura cristalina del dominio I de la integrina alfa-2. El dominio I de la integrina alfa-2 interacciona con el colágeno tipo I que se encuentra en la matriz extracelular. Sin pretender quedar ligados por ninguna teoría o mecanismo de acción particular, la fijación de of Ab 770.8, Ab 774.3, y Ab 778.17 a esta región destruye probablemente la interacción de la integrina alfa-2 y el colágeno tipo I.

Este ejemplo describe un método de determinación de la región diana de la integrina fijada por un agente de fijación de la integrina alfa-2. El examinador describe adicionalmente epítomos reconocidos por tres agentes de fijación representativos de la integrina alfa-2 que tienen actividad anticáncer.

Listado de secuencias

- 5 <110> Weiss, et al.
- <120> AGENTES DE FIJACIÓN DE LA INTEGRINA ALFA-2 Y USO DE LOS MISMOS PARA INHIBIR LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE CÁNCER
- <130> 30275/46156A
- <150> 61/487,812
- 10 <151> 2011-05-19
- <160> 33
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 8
- 15 <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 1
- Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp
- 1 5
- <210> 2
- <211> 8
- 20 <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 2
- Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Glu Asp
- 1 5
- <210> 3
- <211> 13
- 25 <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 3
- Thr Arg Gly Thr Thr Leu Val Ala Pro Gly Phe Asp Val
- 30 1 5 10
- <210> 4
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 4
- Gln Ser Ile Gly Thr Ser
- 35 1 5
- <210> 5
- <211> 3
- <212> PRT
- 40 <213> Mus musculus
- <400> 5
- Tyr Val Ser
- 1
- <210> 6
- <211> 9
- 45 <212> PRT
- <213> Mus musculus

<400> 6
 Gln His Ser Asn Arg Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7
 Gly Tyr Thr Phe Ala Ser Tyr Trp
 1 5

10 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8
 Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr
 1 5

15 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 9
 Ala Arg Leu Gly Arg Gly Pro Phe Ala Tyr
 20 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <400> 10
 Glu Ser Val Asp Ser Tyr Asp Asn Ser Phe
 1 5 10

<210> 11
 <211> 3
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus

<400> 11
 Phe Ala Ser
 1

<210> 12
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12
 Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
 1 5

40 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 13
 Gly Leu Ser Leu Thr Asn Tyr Gly
 1 5

45 <210> 14
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Mus musculus
 <400> 14
 Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr
 1 5
 5 <210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 15
 Leu Ser His Arg Leu Leu
 1 5
 10 <210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 16
 15 Gln Asp Val Gly Thr Ala
 1 5
 <210> 17
 <211> 3
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 17
 Trp Ala Ala
 1
 25 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 18
 Gln Gln Tyr Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 30 <210> 19
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 19

ES 2 748 577 T3

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ala Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Glu Asp Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Ile Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Val Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Gly Thr Thr Leu Val Ala Pro Gly Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
115 120 125

Tyr Pro Leu Val Pro
130

5 <210> 20
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln His Ser Asn Arg Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser
115

10 <210> 21

ES 2 748 577 T3

<211> 126
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 21

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

5

<210> 22
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 22

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

10

ES 2 748 577 T3

<210> 23
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <400> 23
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Leu Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
 50 55 60
 Ser Arg Leu Asn Ile Lys Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp Thr Val Gly Ser Arg Asn Leu
 85 90 95
 Ser His Arg Leu Leu Arg Glu Ser Val Leu Pro Lys Cys
 100 105

<210> 24
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 24
 Gly Tyr Ser Trp Cys Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly
 1 5 10 15
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
 20 25 30
 Leu Ile Tyr Trp Ala Ala Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe
 35 40 45
 Ala Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val
 50 55 60
 Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp
 85 90 95
 Ala Ala Pro Thr Val Ser

100

15 <210> 25
 <211> 1181

ES 2 748 577 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Gly Pro Glu Arg Thr Gly Ala Ala Pro Leu Pro Leu Leu Leu Val
1 5 10 15

Leu Ala Leu Ser Gln Gly Ile Leu Asn Cys Cys Leu Ala Tyr Asn Val
20 25 30

Gly Leu Pro Glu Ala Lys Ile Phe Ser Gly Pro Ser Ser Glu Gln Phe
35 40 45

Gly Tyr Ala Val Gln Gln Phe Ile Asn Pro Lys Gly Asn Trp Leu Leu
50 55 60

Val Gly Ser Pro Trp Ser Gly Phe Pro Glu Asn Arg Met Gly Asp Val
65 70 75 80

Tyr Lys Cys Pro Val Asp Leu Ser Thr Ala Thr Cys Glu Lys Leu Asn
85 90 95

Leu Gln Thr Ser Thr Ser Ile Pro Asn Val Thr Glu Met Lys Thr Asn
100 105 110

Met Ser Leu Gly Leu Ile Leu Thr Arg Asn Met Gly Thr Gly Gly Phe
115 120 125

Leu Thr Cys Gly Pro Leu Trp Ala Gln Gln Cys Gly Asn Gln Tyr Tyr
130 135 140

Thr Thr Gly Val Cys Ser Asp Ile Ser Pro Asp Phe Gln Leu Ser Ala
145 150 155 160

Ser Phe Ser Pro Ala Thr Gln Pro Cys Pro Ser Leu Ile Asp Val Val
165 170 175

Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser Ile Tyr Pro Trp Asp Ala Val Lys
180 185 190

Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val Gln Gly Leu Asp Ile Gly Pro Thr Lys
195 200 205

Thr Gln Val Gly Leu Ile Gln Tyr Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe

5

ES 2 748 577 T3

210		215		220															
Asn 225	Leu	Asn	Thr	Tyr	Lys 230	Thr	Lys	Glu	Glu	Met 235	Ile	Val	Ala	Thr	Ser 240				
Gln	Thr	Ser	Gln	Tyr 245	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr 250	Asn	Thr	Phe	Gly	Ala 255	Ile				
Gln	Tyr	Ala	Arg 260	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Ser 265	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly 270	Arg	Arg				
Ser	Ala	Thr 275	Lys	Val	Met	Val	Val 280	Val	Thr	Asp	Gly	Glu 285	Ser	His	Asp				
Gly	Ser 290	Met	Leu	Lys	Ala	Val 295	Ile	Asp	Gln	Cys	Asn 300	His	Asp	Asn	Ile				
Leu 305	Arg	Phe	Gly	Ile	Ala 310	Val	Leu	Gly	Tyr	Leu 315	Asn	Arg	Asn	Ala	Leu 320				
Asp	Thr	Lys	Asn 325	Leu	Ile	Lys	Glu	Ile	Lys 330	Ala	Ile	Ala	Ser	Ile 335	Pro				
Thr	Glu	Arg	Tyr 340	Phe	Phe	Asn	Val	Ser 345	Asp	Glu	Ala	Ala	Leu 350	Leu	Glu				
Lys	Ala	Gly 355	Thr	Leu	Gly	Glu	Gln 360	Ile	Phe	Ser	Ile	Glu 365	Gly	Thr	Val				
Gln 370	Gly	Gly	Asp	Asn	Phe	Gln 375	Met	Glu	Met	Ser	Gln 380	Val	Gly	Phe	Ser				
Ala 385	Asp	Tyr	Ser	Ser	Gln 390	Asn	Asp	Ile	Leu	Met 395	Leu	Gly	Ala	Val	Gly 400				
Ala	Phe	Gly	Trp 405	Ser	Gly	Thr	Ile	Val	Gln 410	Lys	Thr	Ser	His	Gly 415	His				
Leu	Ile	Phe	Pro 420	Lys	Gln	Ala	Phe	Asp 425	Gln	Ile	Leu	Gln	Asp 430	Arg	Asn				
His	Ser 435	Ser	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Ser 440	Val	Ala	Ala	Ile	Ser 445	Thr	Gly	Glu				
Ser 450	Thr	His	Phe	Val	Ala	Gly 455	Ala	Pro	Arg	Ala	Asn 460	Tyr	Thr	Gly	Gln				

ES 2 748 577 T3

Ile Val Leu Tyr Ser Val Asn Glu Asn Gly Asn Ile Thr Val Ile Gln
465 470 475 480

Ala His Arg Gly Asp Gln Ile Gly Ser Tyr Phe Gly Ser Val Leu Cys
485 490 495

Ser Val Asp Val Asp Lys Asp Thr Ile Thr Asp Val Leu Leu Val Gly
500 505 510

Ala Pro Met Tyr Met Ser Asp Leu Lys Lys Glu Glu Gly Arg Val Tyr
515 520 525

Leu Phe Thr Ile Lys Glu Gly Ile Leu Gly Gln His Gln Phe Leu Glu
530 535 540

Gly Pro Glu Gly Ile Glu Asn Thr Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Ala
545 550 555 560

Leu Ser Asp Ile Asn Met Asp Gly Phe Asn Asp Val Ile Val Gly Ser
565 570 575

Pro Leu Glu Asn Gln Asn Ser Gly Ala Val Tyr Ile Tyr Asn Gly His
580 585 590

Gln Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Ile Leu Gly Ser Asp
595 600 605

Gly Ala Phe Arg Ser His Leu Gln Tyr Phe Gly Arg Ser Leu Asp Gly
610 615 620

Tyr Gly Asp Leu Asn Gly Asp Ser Ile Thr Asp Val Ser Ile Gly Ala
625 630 635 640

Phe Gly Gln Val Val Gln Leu Trp Ser Gln Ser Ile Ala Asp Val Ala
645 650 655

Ile Glu Ala Ser Phe Thr Pro Glu Lys Ile Thr Leu Val Asn Lys Asn
660 665 670

Ala Gln Ile Ile Leu Lys Leu Cys Phe Ser Ala Lys Phe Arg Pro Thr
675 680 685

Lys Gln Asn Asn Gln Val Ala Ile Val Tyr Asn Ile Thr Leu Asp Ala
690 695 700

Asp Gly Phe Ser Ser Arg Val Thr Ser Arg Gly Leu Phe Lys Glu Asn
705 710 715 720

ES 2 748 577 T3

Asn Glu Arg Cys Leu Gln Lys Asn Met Val Val Asn Gln Ala Gln Ser
 725 730 735
 Cys Pro Glu His Ile Ile Tyr Ile Gln Glu Pro Ser Asp Val Val Asn
 740 745 750
 Ser Leu Asp Leu Arg Val Asp Ile Ser Leu Glu Asn Pro Gly Thr Ser
 755 760 765
 Pro Ala Leu Glu Ala Tyr Ser Glu Thr Ala Lys Val Phe Ser Ile Pro
 770 775 780
 Phe His Lys Asp Cys Gly Glu Asp Gly Leu Cys Ile Ser Asp Leu Val
 785 790 795 800
 Leu Asp Val Arg Gln Ile Pro Ala Ala Gln Glu Gln Pro Phe Ile Val
 805 810 815
 Ser Asn Gln Asn Lys Arg Leu Thr Phe Ser Val Thr Leu Lys Asn Lys
 820 825 830
 Arg Glu Ser Ala Tyr Asn Thr Gly Ile Val Val Asp Phe Ser Glu Asn
 835 840 845
 Leu Phe Phe Ala Ser Phe Ser Leu Pro Val Asp Gly Thr Glu Val Thr
 850 855 860
 Cys Gln Val Ala Ala Ser Gln Lys Ser Val Ala Cys Asp Val Gly Tyr
 865 870 875 880
 Pro Ala Leu Lys Arg Glu Gln Gln Val Thr Phe Thr Ile Asn Phe Asp
 885 890 895
 Phe Asn Leu Gln Asn Leu Gln Asn Gln Ala Ser Leu Ser Phe Gln Ala
 900 905 910
 Leu Ser Glu Ser Gln Glu Glu Asn Lys Ala Asp Asn Leu Val Asn Leu
 915 920 925
 Lys Ile Pro Leu Leu Tyr Asp Ala Glu Ile His Leu Thr Arg Ser Thr
 930 935 940
 Asn Ile Asn Phe Tyr Glu Ile Ser Ser Asp Gly Asn Val Pro Ser Ile
 945 950 955 960
 Val His Ser Phe Glu Asp Val Gly Pro Lys Phe Ile Phe Ser Leu Lys
 965 970 975

ES 2 748 577 T3

Val Thr Thr Gly Ser Val Pro Val Ser Met Ala Thr Val Ile Ile His
 980 985 990

Ile Pro Gln Tyr Thr Lys Glu Lys Asn Pro Leu Met Tyr Leu Thr Gly
 995 1000 1005

Val Gln Thr Asp Lys Ala Gly Asp Ile Ser Cys Asn Ala Asp Ile
 1010 1015 1020

Asn Pro Leu Lys Ile Gly Gln Thr Ser Ser Ser Val Ser Phe Lys
 1025 1030 1035

Ser Glu Asn Phe Arg His Thr Lys Glu Leu Asn Cys Arg Thr Ala
 1040 1045 1050

Ser Cys Ser Asn Val Thr Cys Trp Leu Lys Asp Val His Met Lys
 1055 1060 1065

Gly Glu Tyr Phe Val Asn Val Thr Thr Arg Ile Trp Asn Gly Thr
 1070 1075 1080

Phe Ala Ser Ser Thr Phe Gln Thr Val Gln Leu Thr Ala Ala Ala
 1085 1090 1095

Glu Ile Asn Thr Tyr Asn Pro Glu Ile Tyr Val Ile Glu Asp Asn
 1100 1105 1110

Thr Val Thr Ile Pro Leu Met Ile Met Lys Pro Asp Glu Lys Ala
 1115 1120 1125

Glu Val Pro Thr Gly Val Ile Ile Gly Ser Ile Ile Ala Gly Ile
 1130 1135 1140

Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val Ala Ile Leu Trp Lys Leu Gly Phe
 1145 1150 1155

Phe Lys Arg Lys Tyr Glu Lys Met Thr Lys Asn Pro Asp Glu Ile
 1160 1165 1170

Asp Glu Thr Thr Glu Leu Ser Ser
 1175 1180

<210> 26

<211> 399

<212> DNA

5 <213> Mus musculus

<400> 26

ES 2 748 577 T3

gaagtgaagc tggaggagtc agggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc cgtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cagttttact agctattgga tgcactgggt aaaacagagg 120
 cctggacagg gtctagaatg gattggtgct ttttatcctg gaaatagtga agataaatat 180
 aacgagaatt tcaagatcaa ggccaaactg actgcagtca catccgtcaa tactgtctac 240
 atggagctca gcagcctgac aagtgaggac tctgcggctt attattgtac aagagggact 300
 acgtttagtag ctccgggctt cgatgtctgg ggcgcaggga ctacggtcac cgtctcctca 360
 gccaaaaaga caccoccatc tgtctatccc ttggtccct 399

<210> 27
 <211> 348
 <212> DNA
 5 <213> Mus musculus

<400> 27
 gatattgtga tgacacaatc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60
 ttctcctgca gggccagtca gagcattggc acaagcatac actggtatca gcaaagaaca 120
 aatggttctc caaggcttct cataaagtat gtttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 180
 aggttttagtg gcagtgatc agggacagat tttactotta ccatcaacag tgtggagtct 240
 gaagatattg cagattatta ctgtcaacac agtaataggt ggccgctcac gttcggtgct 300
 gggaccaagc tggagctgaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatcc 348

<210> 28
 <211> 378
 10 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 28
 caggtccaac tacagcagcc tggggctgaa ctggtgaggc ctgggacttc agtgaagctg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cacgttcgcc agctactgga tgaactgggt tagtcagagg 120
 cctgagcaag gccttgagtg gattggaagg atcgatcctt acgatagtga aactcactac 180
 aatcaaaagt tcaaggacaa ggccatattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atacaactca acagcctgac atctgaggac tctgcggctt attactgtgc aagattaggg 300
 agggggcctt ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc agccaaaacg 360
 acaccccat ctgtctat 378

<210> 29
 <211> 360
 <212> DNA
 15 <213> Mus musculus

<400> 29
 20 gatattgtga tgaccagac tocaacttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agttatgaca acagttttat gtattgttac 120
 cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatt ttgcatcaa cctagaatct 180
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggt tctaggacag acttcaccct caccattgat 240
 cctgtggagg ctgatgatgc tgcaacctat tactgtcagc aaaataatga ggatccgtac 300
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 360

<210> 30

ES 2 748 577 T3

<211> 327
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 30
 gaggtacagc tgcaggagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60
 acctgcacag tctctggttt gtcattaact aattatgggtg tccactgggt tgcgcagtct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atttggagtg gtggaaacac agactataac 180
 gcagctttca tatccagact gaacatcaag aaggacaatt ccaagaacca agtcttcttt 240
 aaaatgaaca gtctgcaagt taatgacaca gtcgggtcaa ggaacctcag tcacctctc 300
 5 ctcagagagt cagtccttcc caaatgt 327

<210> 31
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

10 <400> 31
 ggatacagtt ggtgcagcat cacctgcaag gccagtcagg atgtgggtac tgctgtcgcc 60
 tggatcaac agaaaccagg gcaatctcct aaattactga ttactgggc agccaccgg 120
 cacactggag tcctgatcg ctctgcaggc agtggatctg ggacagactt cactctcacc 180
 attagcaatg tgcagtctga agacttggca gattatttct gtcaacaata tagcacctat 240
 ccactcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gggctgatgc tgcaccaact 300
 gtatcc 306

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 32
 Tyr Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe Asn Leu Asn Thr Tyr Lys
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 33
 Ala Ile Ala Ser Ile Pro Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val Ser
 1 5 10 15

25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo que se fija a ambas de SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33.
- 5 2. El anticuerpo anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo inhibe la proliferación de las células de cáncer en cultivo de células tridimensional.
3. El anticuerpo anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde
 - (a) CDR-H1 es SEQ ID NO: 1, CDR-H2 es SEQ ID NO: 2, CDR-H3 es SEQ ID NO: 3, CDR-L1 es SEQ ID NO: 4, CDR-L2 es SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 es SEQ ID NO: 6;
 - 10 (b) CDR-H1 es SEQ ID NO: 7, CDR-H2 es SEQ ID NO: 8, CDR-H3 es SEQ ID NO: 9, CDR-L1 es SEQ ID NO: 10, CDR-L2 es SEQ ID NO: 11 y CDR-L3 es SEQ ID NO: 12;
 - (c) CDR-H1 es SEQ ID NO: 13, CDR-H2 es SEQ ID NO: 14, CDR-H3 es SEQ ID NO: 15, CDR-L1 es SEQ ID NO: 16, CDR-L2 es SEQ ID NO: 17 y CDR-L3 es SEQ ID NO: 18.
- 15 4. El anticuerpo anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo anti-integrina alfa-2 es un anticuerpo monoclonal.
5. El anticuerpo anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo anti-integrina alfa-2 es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación a antígeno de los mismos.
- 20 6. El anticuerpo anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde el anticuerpo anti-integrina alfa-2 comprende
 - (a) una cadena pesada, en donde dicha cadena pesada comprende un polipéptido que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia dada en (a) SEQ ID NO: 19; (b) SEQ ID NO: 21; o (c) SEQ ID NO: 23, y
 - (b) una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende un polipéptido que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia dada en (a) SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 22; o SEQ ID NO: 24.
- 25 7. El anticuerpo anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo de la reivindicación 1 que comprende:
 - (a) cadenas pesadas que comprenden un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 19, y cadenas ligeras que comprenden un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 20;
 - (b) cadenas pesadas que comprenden un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 21, y cadenas ligeras que comprenden un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 22; o
 - 30 (c) cadenas pesadas que comprenden un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 23, y cadenas ligeras que comprenden un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 24.
- 35 8. El anticuerpo anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo inhibe la proliferación de las células de cáncer en un cultivo de células tridimensional cuando el anticuerpo o fragmento de fijación a antígeno del mismo está presente a una concentración de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 500 nM.
9. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8.
10. Un vector de clonación o expresión que comprende uno o más polinucleótidos de la reivindicación 9.
- 40 11. Una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de la reivindicación 10.
12. Un proceso para la producción de un anticuerpo anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo, que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 11 y aislar el anticuerpo de fijación anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo.
- 45 13. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-integrina alfa-2 o fragmento de fijación a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.