

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 385**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2011 PCT/US2011/058076**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12058418**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2011 E 11837082 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2632489**

54 Título: **Composiciones direccionadas al dominio extracelular soluble de la Cadherina-E y procedimientos relacionados para la terapia del cáncer**

30 Prioridad:

27.10.2010 US 407367 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2020

73 Titular/es:

**THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE
UNIVERSITY OF NEW YORK (100.0%)
35 State Street
Albany NY 12207-2826, US**

72 Inventor/es:

**BROUXHON, SABINE;
O'BANION, M. KERRY y
KYRKANIDES, STEPHANOS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 784 385 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

Composiciones direccionadas al dominio extracelular soluble de la Cadherina-E y procedimientos relacionados para la terapia del cáncer

5

DECLARACIÓN RELATIVA A LA INVESTIGACIÓN FINANCIADA POR EL GOBIERNO FEDERAL

Esta invención se hizo con el apoyo del gobierno otorgado por los Institutos Nacionales de Salud en virtud de las Concesiones No. CA133910 y ES015832. El gobierno de los EE.UU. tiene ciertos derechos en esta invención.

10

CAMPO DE LA INVENCION

Las composiciones y los procedimientos de la presente invención se refieren al direccionamiento del dominio extracelular de la proteína cadherina-E de adhesión célula a célula. Las composiciones incluyen agentes de unión, tales como anticuerpos, así como también fragmentos antigénicos del dominio extracelular de la cadherina-E que pueden usarse en procedimientos terapéuticos y profilácticos para tratar el cáncer.

15

ANTECEDENTES

La cadherina-E es una glucoproteína transmembrana integral que ayuda a mantener la adhesión epitelial célula a célula. Se ha demostrado que la pérdida de función de la cadherina-E (en su longitud completa) produce una desdiferenciación celular, una proliferación y una mayor invasividad en los cánceres de piel, de pulmón, de estómago, de intestino y de mama (Brouxhon y col., Cancer Res. 67(16):7654-7664 (2007); Hirohashi, Am. J. Pathol. 153(2):333-339 (1998); Chen y col., Cancer Lett. 201:97-106 (2003)). Además, la pérdida de tinción con cadherina-E en muestras de biopsia de pacientes con cáncer de mama se ha asociado a un mal pronóstico y a períodos cortos sin metástasis (Pederson y col., Brit. J. Cancer 87:1281-1286 (2002)).

20

La proteína de longitud completa está compuesta por un dominio extracelular que consta de cinco subdominios designados, EC1-EC5, una sola región transmembrana y un dominio citoplasmático (véase Shiraishi y col., J. Immunol. 175(2):1014-1021 (2005)). El subdominio EC1, que es el más distante de la superficie de la membrana celular, contiene un triplete de histidina-alanina-valina (HAV) que se encuentra en las células que expresan cadherina (incluyendo las células que expresan la cadherina-E, -N, -P y -R), y se cree que este subdominio es esencial para promover el contacto célula a célula mediado por la cadherina-E (Beavon, European J. Cancer 36:1607-1620 (2000)). El documento WO 94/11401 A1 (Univ Yale) describe anticuerpos que se dirigen a EC1.

30

La cadherina-E de longitud completa contiene un sitio de escisión para varias proteasas cerca del dominio transmembrana, y la escisión en ese sitio produce un péptido de extremo terminal N soluble de ~80-84 kDa llamado cadherina-E soluble (sEcad). El desprendimiento de la sEcad ocurre constitutivamente a niveles bajos en células epiteliales normales no estimuladas y a niveles elevados en pacientes con tumores derivados del epitelio, como los cánceres de mama, de piel, de pulmón, de próstata, gástrico y colorrectal (Banks y col., J. Clin. Pathol. 48:179-180 (1995); Baranwal y col., Biochem. Biophys. Res. Com. 384(1):6-11 (2009); Chan y col., Gut 48:808-811 (2001); Charalabopoulos y col., Exp. Oncol. 28(1):83-85 (2006); Kuefer y col., Clin. Cancer Res. 9:6447-6452 (2003); Shirahama y col., J. Dermatol. Sci. 13:30-36 (1996); Velikova y col., Br. J. Cancer 77:1857-1863 (1998)). También se ha informado que el desprendimiento de la sEcad aumenta en las células renales caninas no cancerosas normales después de la inducción de la apoptosis (Steinhusen y col., J. Biol. Chem 276:4972-4980 (2001)).

35

Si bien los niveles de sEcad aumentan en la orina o el suero de los pacientes con cáncer, y se elevan cuando las células normales sufren la apoptosis, la actividad biológica de esta proteína no se conoce bien. Varios estudios han demostrado que la sEcad interrumpe la adhesión normal de célula a célula epitelial, induce la dispersión de células epiteliales y mejora la proliferación, migración e invasión de las células tumorales (Gil y col., Gynecol. Oncol. 108(2):361-369 (2008); Maretzky y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 102(26):9182-9187 (2005); Marambaud y col., EMBO J. 21(8):1948-1956 (2002); Najy y col., J. Biol. Chem. 283(26):18393-18401 (2008); Noe y col., J. Cell Sci. 114:111-118 (2001); Ryniers y col., Biol. Chem. 383:159-165 (2002); y Symowicz y col., Cancer Res. 67(5):2030-2039 (2007)). Las vías de señalización que modulan estas funciones biológicas aún no están claras. Los estudios que usan la línea celular de cáncer de mama SKBr3 demostraron que los complejos sEcad-HER2 fueron inducidos por la adición exógena de una proteína de fusión extracelular purificada (Fc-sEcad), lo que condujo a la activación de la quinasa regulada por la señal extracelular (ERK) (Najy y col., J. Biol. Chem 283(26):18393-18401 (2008)). El receptor EGF humano pertenece a la familia de receptores de tirosina quinasas ErbB o HER, que están sobreexpresados o desregulados en muchos tumores epiteliales (Mendelsohn y Baselga, Oncogene 19:6550-6565 (2000); Burgess, Growth Factors 26:263-274(2008)). Esta familia de receptores activa moléculas de señalización aguas abajo como

50

55

60

ERK, que, a su vez, activa una variedad de comportamientos de las células cancerosas, incluyendo la proliferación celular, la migración, la invasión y la angiogénesis (Hanahan y Weinberg, Cell 100:57-70 (2000); Shields y col., Trends Cell Biol. 10:147-154 (2000)). En consecuencia, se han desarrollado varias terapias anti-EGF. Estos incluyen inhibidores de moléculas pequeñas de tirosina quinasa, anticuerpos monoclonales y vacunas contra el cáncer (Fukuoka y col., Proc. A.m. Soc. Clin. Oncol. 21:292a Abs1188 (2002); Lage y col., Ann. Med. 35:327-336 (2003); Mateo y col., Immunotechnology 3:71-81 (1997); Slamon y col., N. Engl. J. Med. 344:783-792 (2001); y Yu y col., J. Clin. Invest. 110:289-294 (2002)). Estas estrategias terapéuticas están limitadas porque solo algunos tumores, en una etapa de maduración definida, expresan el receptor/antígeno específico y no todos los tumores con una determinada histología y etapa sobreexpresan el receptor/antígeno diana (solo del 20 al 50 % de los cánceres de mama sobreexpresan el receptor de EGF). Por consiguiente, las tasas de respuesta para este tipo de fármacos siguen siendo bajas (Mendelson y Baselga, Oncogene 19:6550-6565 (2000); Ortega y col., Cancer Control 17(1):7-15 (2010)). Además, los tumores que inicialmente responden a estos fármacos finalmente desarrollan resistencia adquirida (Jackman y col., Clin. Cancer Res. 12:3908-3914 (2006); Ortega y col., Cancer Control 17(1):7-15 (2010); y Riely y col., Clin. Cancer Res. 12:839-844 (2006)).

RESUMEN

La presente invención se basa, en parte, en nuestro descubrimiento de que dirigir epítomos dentro de uno o más de los subdominios EC2-EC5 de la cadherina-E da como resultado la muerte de células tumorales derivadas del epitelio, pero no mata las células epiteliales o no epiteliales normales y sanas, incluyendo las células endoteliales y los fibroblastos, en cualquier medida apreciable (*por ejemplo*, en cualquier medida clínicamente perjudicial). En consecuencia, las composiciones descritas incluyen polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de uno o más de los subdominios EC2-EC5 de cadherina-E y variantes biológicamente activas de los mismos; vectores de expresión y células para expresar tales polipéptidos; y agentes (*por ejemplo*, anticuerpos) que se dirigen a los subdominios EC2-EC5. Los procedimientos descritos incluyen procedimientos para identificar y producir polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de uno o más de los subdominios EC2-EC5 de cadherina-E o una variante biológicamente activa de los mismos; procedimientos para generar agentes, tales como anticuerpos, que se dirigen a estos polipéptidos; y procedimientos para administrar tales agentes u obtener su producción *in vivo* para tratar los cánceres epiteliales o reducir el riesgo de su aparición o recurrencia. A fin de facilitar la lectura, no nos referiremos a variantes biológicamente activas en cada oportunidad; debe entenderse que cuando es posible fabricar y usar, como se describe en esta invención, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos encontrada en uno o más de los subdominios EC2, EC3, EC4 y EC5 de una cadherina-E natural, también es posible fabricar y usar una variante biológicamente activa de ese polipéptido.

Los procedimientos en los que se administran los anticuerpos anti-cadherina-E abarcan terapias específicas de la dosis, y las terapias se pueden dirigir selectivamente hacia citotóxicos para los cánceres de mama, de pulmón, de colon, de próstata y de piel, así como también para otros cánceres epiteliales y cánceres de tejidos derivados del ectodermo (*por ejemplo*, el sistema nervioso central, la lente del ojo, los ganglios, nervios craneales y sensoriales, y el tejido conectivo en la cabeza). Los procedimientos terapéuticos y profilácticos descritos en esta invención pueden llevarse a cabo en conexión con otras terapias citotóxicas (*por ejemplo*, quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia y terapias basadas en anticuerpos (*por ejemplo*, terapia con anticuerpos monoclonales anti-EGF)). En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se dirige específicamente a uno o más del segundo, el tercero, el cuarto o el quinto subdominio (EC2, EC3, EC4 y EC5, respectivamente) de cadherina-E soluble (sEcad), pero no es el primer subdominio (EC1) de sEcad a usar en un procedimiento para el tratamiento del cáncer, donde el anticuerpo se administra en una cantidad que mata selectivamente las células cancerosas, pero no mata las células sanas normales en ningún grado clínicamente perjudicial.

También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo del primer aspecto, donde la formulación farmacéutica está libre de una cantidad citotóxica de un excipiente.

Las realizaciones son proporcionadas por las reivindicaciones dependientes.

En un aspecto relacionado, se describen procedimientos para tratar a un paciente que tiene cáncer, mediante, *entre otros*, la administración al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente que se dirige específicamente a uno o más del segundo, el tercero, el cuarto o el quinto subdominio (EC2, EC3, EC4 y EC5, respectivamente) de la cadherina-E soluble (sEcad), pero no el primer subdominio (EC1) de la sEcad. El agente puede direccionarse específicamente a EC4 y/o EC5. Donde hay solo subdominio (*por ejemplo*, EC4 o EC5) diana, el agente puede unir residuos de aminoácidos confinados a ese dominio. El agente puede ser un andamio de proteínas, como un anticuerpo, un fragmento u otra variante del mismo, que se une específicamente a un epítipo que comprende residuos de aminoácidos en uno o más de los subdominios EC2, EC3, EC4 o EC5 de la sEcad, pero no en el subdominio EC1 de

la sEcad.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, quimérico, murino o humano. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo monocatenario; monoclonal o policlonal (*por ejemplo*, una inmunoglobulina de la clase IgG o IgM).

- 5 Independientemente de la naturaleza precisa del agente, el mismo puede marcarse de forma detectable (*por ejemplo*, con una etiqueta fluorescente o quimioluminiscente).

- Con respecto al impacto en las células biológicas, el agente se puede caracterizar como uno que mata las células malignas que expresan la cadherina-E, pero no mata las células no malignas de manera significativa o apreciable. La muerte se puede lograr induciendo muerte celular programada, detención del crecimiento, anoikis, necrosis, autofagia u otro estado que resulte en la muerte celular.
- 10

- Los agentes descritos pueden formularse como formulaciones o preparaciones farmacéuticas que están libres de cantidades citotóxicas de un excipiente u otro ingrediente "inerte". Más específicamente, las composiciones farmacéuticas o farmacéuticamente aceptables se pueden formular para administrar a un paciente mediante administración oral, intravenosa, nasal o inhalación (*por ejemplo*, insuflación), administración intramuscular, intraperitoneal, transmucosa (*por ejemplo*, formuladas para la administración al tejido mucoso, como el que recubre el recto o la vagina) o transdérmica. Si bien discutimos las dosis más adelante, observamos aquí que el agente puede administrarse en una formulación farmacéutica que contiene aproximadamente de 1 a alrededor de 400 µg/ml del agente (*por ejemplo*, aproximadamente de 4 a alrededor de 20 µg/ml del agente). La dosificación también puede ser tal que, tras la administración a un paciente, el nivel sérico del paciente del agente farmacéutico activo sea aproximadamente de 1 a 10 mg/kg (*por ejemplo*, aproximadamente de 1 a 5 mg/kg). Cuando se usa en cultivo celular, la dosificación puede ser tal que, tras la adición al medio de cultivo, el agente farmacéutico activo esté presente en aproximadamente 1 a 500 µg/ml de medio de cultivo celular (*por ejemplo*, aproximadamente de 1 a 400 µg/mL). Como se reconoce en la técnica, las dosis pueden variar en diferentes formulaciones, y las dosis dentro de las presentes formulaciones o preparaciones farmacéuticas pueden variar dependiendo de la presencia, ausencia o cantidad relativa de aditivos en la formulación (*por ejemplo*, según lo suministrado por un fabricante). Por consiguiente, los procedimientos descritos abarcan aquellos en los que el agente se administra en una formulación farmacéutica que: (a) produce, tras la administración a un paciente, un nivel sérico del agente de aproximadamente 1-10 mg/kg (*por ejemplo*, aproximadamente de 1 a 5 mg/kg), o (b) produce, tras la adición a un cultivo celular, una concentración del agente de aproximadamente 1 a 500 µg/ml (1-400 µg/ml) de medio de cultivo celular.
- 15
- 20
- 25
- 30

- En cualquiera de los procedimientos descritos en los que se administra un agente de direccionamiento de sEcad, el procedimiento puede incluir una etapa en la que se proporciona una muestra biológica del paciente (*por ejemplo*, antes de administrar el agente diana y/o en algún momento después de administrar el agente diana) y determinar si la muestra incluye un nivel elevado de sEcad u otro biomarcador predictivo para el cáncer. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, una muestra de orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre o una biopsia. Cuando se lleva a cabo dicha etapa antes de administrar el agente, un nivel elevado de sEcad puede indicar que el paciente es un buen candidato para el tratamiento. Cuando se lleva a cabo dicha etapa una o más veces después de administrar el agente, un nivel reducido de sEcad puede indicar que el paciente está respondiendo bien al tratamiento.
- 35
- 40

- En cualquiera de los procedimientos descritos, también se puede administrar un segundo tratamiento contra el cáncer. Por ejemplo, uno puede administrar un agente quimioterapéutico, un tratamiento de radiación, un tratamiento con un anticuerpo (*es decir*, un anticuerpo que es útil en el tratamiento de un cáncer y se une específicamente a una diana que no sea la sEcad) o una intervención quirúrgica.
- 45

- Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen aquellos que tienen un cáncer dentro de un tejido epitelizado. El cáncer puede ser un cáncer del tracto digestivo (*por ejemplo*, boca, garganta, esófago, estómago, intestino, recto o ano), del sistema nervioso central, de mama, de piel (*por ejemplo*, un carcinoma de células escamosas o un melanoma), del sistema reproductor (*por ejemplo*, cáncer cervical, uterino, de ovario, vulvar o labial, de próstata, testicular o del tracto genital masculino), de pulmón o del tracto urinario.
- 50

- Los procedimientos pueden ser terapéuticos o profilácticos. En consecuencia, en otro aspecto relacionado, se describen procedimientos para reducir la probabilidad de que un sujeto desarrolle cáncer. Estos procedimientos pueden llevarse a cabo administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de (a) un polipéptido antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos de uno o más de los subdominios EC2-EC5 de sEcad, pero excluye el subdominio EC1, un fragmento antigénicamente activo u otra variante del mismo, o (b) un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido antigénico, el fragmento antigénicamente activo u otra variante del mismo. El polipéptido antigénico puede incluir una secuencia de aminoácidos que está confinada dentro de EC4, de EC5, o que abarca la secuencia de EC4 y EC5. El polipéptido antigénico puede provocar
- 55
- 60

la producción de anticuerpos que se unen específicamente a sEcad, pero no se unen a la cadherina-E expresada por células no malignas en el sujeto. Los polipéptidos antigénicos y los vectores de expresión empleados en estos procedimientos pueden formularse de la misma manera o de un modo similar a las formulaciones descritas anteriormente. Por ejemplo, pueden administrarse por vía oral, intravenosa (que puede ser preferible a la administración oral), nasal o mediante inhalación (*por ejemplo*, insuflación), por vía intramuscular, intraperitoneal, administración transmucosa o transdérmica. Los riesgos que enfrenta el sujeto pueden ser el riesgo de desarrollar cualquiera de los tipos de cáncer descritos en esta invención. El riesgo puede ser un riesgo promedio basado en la tasa general de ocurrencia en la población, o puede ser un riesgo mayor debido a una predisposición genética o una aparición más temprana del cáncer. Por ejemplo, los polipéptidos antigénicos o los vectores que los codifican pueden administrarse a un sujeto para reducir el riesgo de aparición o recurrencia de un cáncer dentro de un tejido epitelizado; un cáncer del tracto digestivo (*por ejemplo*, boca, garganta, esófago, estómago, intestino, recto o ano), del sistema nervioso central, de mama, de piel (*por ejemplo*, un carcinoma de células escamosas o melanoma), del sistema reproductor (*por ejemplo*, cáncer cervical, uterino, de ovario, vulvar o labial, de próstata, testicular o del tracto genital masculino), de pulmón o del tracto urinario.

Los procedimientos descritos pueden expresarse en términos de la preparación de un medicamento. En consecuencia, la invención se refiere al uso de los agentes y composiciones descritos en esta invención en la preparación de un medicamento. El uso de los agentes y composiciones se extiende a la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer (incluyendo los tipos de cáncer descritos en esta invención).

Las composiciones de la invención incluyen composiciones farmacéuticamente aceptables que incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de (a) un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo que comprende residuos de aminoácidos en uno o más de los subdominios EC2, EC3, EC4 o EC5 de la sEcad, pero no en el subdominio EC1 de la sEcad. Las composiciones pueden incluir (b) un polipéptido antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos de uno o más de los subdominios EC2-EC5 de sEcad, pero excluye el subdominio EC1, o un fragmento antigénicamente activo u otra variante del mismo; o (c) un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido antigénico, el fragmento antigénicamente activo u otra variante del mismo.

En incluso otro aspecto relacionado, la presente invención presenta procedimientos para identificar un epítipo en una sEcad. Estos procedimientos pueden llevarse a cabo mediante, *inter alia*: (a) proporcionar un polipéptido que comprende sEcad, un fragmento u otra variante del mismo; (b) administrar el polipéptido a un animal; (c) aislar anticuerpos producidos por el animal en respuesta al polipéptido; y (d) exponer células cancerosas a los anticuerpos o a un anticuerpo monoclonal generado a partir de los mismos. La muerte de las células cancerosas indica que el polipéptido comprende un epítipo de sEcad que puede ser dirigido o usado como agente en el tratamiento del cáncer, la profilaxis o las imágenes. Como se describió anteriormente, el polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos de uno o más de los subdominios EC2, EC3, EC4 o EC5 de sEcad, pero excluye la secuencia de aminoácidos del subdominio EC1 de sEcad. Por ejemplo, el polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos de uno o más de EC4 y/o EC5 (*por ejemplo*, una secuencia de aminoácidos confinada a EC4 o una secuencia de aminoácidos confinada a EC5).

Uno de los mayores desafíos en el desarrollo de tratamientos contra el cáncer radica en encontrar agentes terapéuticos que puedan distinguir entre las células cancerosas y los tejidos sanos normales. Muchos de las quimioterapias disponibles actualmente son citotóxicas y no selectivas, y tienen un índice terapéutico estrecho, lo que resulta en una toxicidad sistémica por fármacos que debilita a los pacientes y aumenta la mortalidad general de los pacientes. Por consiguiente, un atributo altamente deseable de las nuevas terapias contra el cáncer es la capacidad de dirigirse selectivamente a las células cancerosas, sin afectar de manera negativa a las células y los tejidos sanos normales. Si bien las composiciones de la presente invención no se limitan a aquellas que impactan las células en cualquier punto particular en una ruta de señalización, nuestra expectativa es que las composiciones terapéuticas de la presente invención actuarán aguas arriba del receptor HER2 y capturarán una gama más amplia de dianas aguas abajo que los tratamientos dirigidos a HER2.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción que se encuentra a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La fig. 1A muestra la secuencia de aminoácidos de la cadherina-E humana (SEQ ID NO:1), con los subdominios extracelulares EC2-EC5 indicados por subrayado alterno (EC2 y EC4 subrayados con líneas dobles, y tanto EC3 como EC5 subrayados con líneas simples).

La fig. 1B es una representación esquemática de una cadherina-E humana de tipo salvaje con la sEcad como se indica. La longitud del fragmento soluble puede variar y puede terminar en el 4^{to} o 5^{to} dominio extracelular o, en otros casos, en el dominio transmembrana (véase, por ejemplo, el estudio de Noe y col., J. Cell Sci. 114(1):111-118, 2000).

5

La fig. 2A es un gráfico lineal que representa el número de tumores palpables en ratones, a lo largo del tiempo, después del tratamiento con solución salina o α -sEcad, como se describe en el Ejemplo 5.

La fig. 2B es un panel de fotografías que muestran, a la izquierda, los tumores visibles en un ratón tratado con solución salina, frente a los de un ratón tratado con α -sEcad (como se describe en el Ejemplo 5). También se muestran tumores extirpados quirúrgicamente, así como también preparaciones histológicas de tejido de ratones no tratados (solución salina) y tratados (α -sEcad).

La fig. 2C es un par de gráficos de barras que ilustran la diferencia en el peso del tumor (g) y el volumen (cm³) en ratones no tratados (solución salina) y tratados (α -sEcad).

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Como se describe adicionalmente a continuación, probamos la efectividad de una variedad de anticuerpos monoclonales y policlonales disponibles comercialmente dirigidos al dominio extracelular de cadherina-E, incluyendo el anticuerpo DECMA-1 empleado por Espada y col. (J. Cell Physiol. 219:84-93 (2009)), Fouquet y col. (J. Biol. Chem. 279(41):43061-43069 (2004)) y Galaz y col. (J. Cell Physiol. 205(1):86-96 (2005)) en un panel de células cancerosas epiteliales y células no cancerosas. Cuando repetimos estos experimentos, descubrimos que la aplicación de este anticuerpo en concentraciones tan bajas como 40 μ g/mL indujo sorprendentemente la muerte celular en ambas células cancerosas (*es decir*, MCF-7, SCC12b, SCC13, CRL-1555, PAM212, SP308 y KLN205), así como también en células no cancerosas que se emplearon como controles (*es decir*, células epiteliales del seno humano y células PHK y PMK). Además, el tratamiento de estas células cancerosas y no cancerosas con el anticuerpo de control del isotipo IgG en las mismas concentraciones (40 μ g/ml) también indujo el mismo nivel de muerte celular en ambos tipos celulares. Estos datos sugieren una inducción no específica de muerte celular después de la aplicación del anticuerpo. En nuestro laboratorio, la aplicación de una solución más diluida del anticuerpo dirigida a los dominios extracelulares EC2-EC5 de la cadherina-E (una dosis baja de 10-20 μ g/ml) indujo la muerte celular, aparentemente por apoptosis, solo en las células cancerosas. No observamos efectos adversos en las células no cancerosas. Además, la aplicación del isotipo IgG de control a células no cancerosas en una concentración de 10-20 μ g/ml no tuvo un efecto detectable sobre la viabilidad celular en general. Estas concentraciones entre 10 y 20 μ g/mL son ~20-50 veces menores que la concentración usada por Espada y col. (J. Cell Physiol. 219:84-93 (2009)), Fouquet y col. (J. Biol. Chem. 279(41):43061-43069 (2004)) y Galaz y col. (J. Cell Physiol. 205(1):86-96 (2005)). En consecuencia, esperamos que las formulaciones y preparaciones farmacéuticas actuales puedan prepararse y usarse como formulaciones de dosis baja (*por ejemplo*, en dosis inferiores a las sugeridas por Espada y otros en estudios previos).

Como se describió anteriormente, la aplicación exógena de 10-20 μ g/ml de anticuerpos (monoclonales o policlonales) contra los subdominios EC2-EC5 de la cadherina-E mató selectivamente un panel representativo de líneas celulares tumorales humanas y de ratón. También tenemos datos que muestran que dichos anticuerpos son citotóxicos para la línea celular de colon humano HT29, la línea celular de pulmón humano NCI-H292 y la línea celular de cáncer de pulmón murino KLN205. Además, demostramos que las células no cancerosas, incluyendo las células epiteliales mamarias humanas normales, los queratinocitos humanos y de ratón normales, los fibroblastos 3T3 de ratón y las células endoteliales humanas no se vieron afectadas en nuestros análisis al usar anticuerpos que se dirigen a los subdominios en bajas concentraciones. Aún no se han dilucidado las vías moleculares por las cuales el direccionamiento de combinaciones variables de los dominios extracelulares EC2-EC5 de cadherina-E en células tumorales derivadas del epitelio induce la muerte celular. Sin embargo, demostramos que las células cancerosas moribundas aumentaron el marcador proapoptótico p53; observamos esta regulación positiva en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, SCC de ratón y cáncer de pulmón KLN205 de ratón después del tratamiento con el anticuerpo contra los dominios cadherina-E EC2-EC5.

Como se indicó anteriormente, las composiciones de la invención incluyen anticuerpos que se dirigen específicamente a uno o más de los subdominios EC2, EC3, EC4 y EC5 de sEcad (pero no EC1). Estos anticuerpos pueden inhibir posteriormente la sEcad, o pueden unirse, inhibir o secuestrar otra diana, como un receptor de supervivencia celular, en el microentorno de células tumorales. Si bien las presentes composiciones no se limitan a aquellas que ejercen su efecto mediante un mecanismo particular, nuestra hipótesis de trabajo es que los anticuerpos de la invención interfieren con la capacidad de la sEcad para proporcionar señales beneficiosas destinadas a las células cancerosas. Por ejemplo, planteamos la hipótesis de que las células cancerosas secretan sEcad en el microentorno donde este

60

último proporciona un andamio funcional que imita el contacto normal de célula a célula. Por consiguiente, la eliminación real o efectiva de sEcad del microentorno tumoral perturba la capacidad de las células tumorales para permanecer adherentes y sobrevivir. En otros casos, un anticuerpo de la invención puede inhibir la actividad de la sEcad al unirse a un epítipo en sEcad que interactúa con otra diana celular (*por ejemplo*, HER-2), alterando así los eventos de señalización aguas abajo implicados en la supervivencia celular, la proliferación celular, la migración y/o la invasión celular. Alternativamente, o además, un anticuerpo puede no unirse a un epítipo específico requerido para la señalización de sEcad, sino que puede unirse a la sEcad de una manera tal que la secuestra, la marca o la ataca para su destrucción, reduciendo así su concentración en el microentorno tumoral y haciendo que no esté disponible para imitar las interacciones célula a célula o unirse a los receptores celulares. Por ejemplo, los anticuerpos y las composiciones pueden reducir el desprendimiento de la sEcad, por ejemplo, uniéndose a la cadherina-E y bloqueando el sitio de escisión, bloqueando o inhibiendo la liberación de sEcad. Por consiguiente, una composición o anticuerpo, como se describe en esta invención, puede dirigirse específicamente a uno o más de los subdominios EC2-EC5, evitando efectivamente que la sEcad proporcione una o más de las señales que, de otro modo, interferiría con un epítipo específico o realmente reduciría los niveles de sEcad.

Para facilitar la lectura, podemos referirnos a un agente que se dirige específicamente a los residuos de aminoácidos en uno o más de los subdominios EC2-EC5 de sEcad, pero no en el primer subdominio (EC1) de sEcad más simplemente como un agente de direccionamiento. Los agentes de direccionamiento pueden ser un andamio de proteínas, como un dominio de fibronectina modificado o una inmunoglobulina, o un fragmento u otra variante del mismo, que se une específicamente a residuos de aminoácidos en uno o más de los subdominios EC2-EC5 de la sEcad (pero no a EC1 de la sEcad). Cuando el agente es, o incluye, una proteína (*por ejemplo*, un andamio de proteínas o un polipéptido antigénico), podemos referirnos al agente como un agente terapéutico basado en proteínas. Tendemos a usar el término "proteína" para referirnos a polímeros de aminoácidos más largos, y tendemos a usar el término "polipéptido" para referirnos a secuencias más cortas o a una cadena de residuos de aminoácidos dentro de una molécula o complejo más grande. Sin embargo, ambos términos están destinados a describir una entidad de dos o más aminoácidos de subconjuntos, análogos de aminoácidos u otros peptidomiméticos, independientemente de la modificación postraducciona (*por ejemplo*, amidación, fosforilación o glicosilación). Los residuos de aminoácidos del subconjunto pueden estar enlazados mediante enlaces peptídicos u otros enlaces tales como, por ejemplo, enlaces éster o éter. Los términos "aminoácido" y "residuo de aminoácido" se refieren a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que pueden ser isómeros ópticos en forma de D o L.

Los anticuerpos anti-sEcad pueden asumir diversas configuraciones y abarcar proteínas que consisten en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Puede usarse cualquiera de una variedad de estructuras de anticuerpos, que incluyen un anticuerpo intacto, multímeros de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos u otras variantes de los mismos que incluyen regiones funcionales de unión a antígeno del anticuerpo. Podemos usar el término "inmunoglobulina" como sinónimo de "anticuerpo". Los anticuerpos pueden ser de origen monoclonal o policlonal. Independientemente de la fuente del anticuerpo, los anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos intactos, por ejemplo, tetrámeros de IgG que tienen dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), anticuerpos de cadena única, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos injertados (con CDR) de región determinante complementaria, así como también fragmentos de anticuerpos, *por ejemplo*, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv y anticuerpos recombinantes derivados de dichos fragmentos, *por ejemplo*, camelbodies, microanticuerpos, diacuerpos y anticuerpos biespecíficos.

Un anticuerpo intacto es uno que comprende una región variable de unión al antígeno (V_H y V_L), así como también un dominio constante de cadena ligera (C_L) y dominios constantes de cadena pesada, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (*por ejemplo*, dominios constantes de secuencia de secuencia nativa humana) o variantes de la secuencia de aminoácidos de los mismos. Como es bien sabido en la técnica, las regiones V_H y V_L se subdividen adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), intercaladas con las regiones de estructura (FR) más conservadas. Se ha definido la extensión de las FR y CDR (véase Kabat y col. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, EE.UU. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH No. 91-3242, 1991 y Chothia, y col., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). La CDR de un anticuerpo típicamente incluye secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa.

Un anticuerpo anti-sEcad puede ser de cualquier clase de inmunoglobulina, por ejemplo, IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como también sus subtipos (*por ejemplo*, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄)), y las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de los tipos kappa o lambda. Los genes de inmunoglobulina humana reconocidos incluyen kappa, lambda, alfa (IgA₁ e IgA₂), gamma (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), delta, épsilon y genes de región constante mu, así como también el sinnúmero de genes de región variable de inmunoglobulina.

El término "porción de unión al antígeno" de una inmunoglobulina o un anticuerpo se refiere generalmente a una porción de una inmunoglobulina que se une específicamente a una diana, en este caso, un epítipo que comprende residuos de aminoácidos dentro o entre uno o más del segundo al quinto subdominio de la sEcad (*por ejemplo*, dentro o entre el cuarto y el quinto subdominio). Por lo tanto, una porción de unión a antígeno de una inmunoglobulina es una molécula en la que una o más cadenas de inmunoglobulina no son de longitud completa, pero que se une específicamente a una diana celular. Los ejemplos de porciones o fragmentos de unión al antígeno incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VLC, VHC, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fv que consiste en los dominios VLC y VHC de un solo brazo de un anticuerpo, y (v) una CDR aislada que tiene una estructura suficiente para unirse específicamente, *por ejemplo*, una porción de unión a antígeno de una región variable. Una porción de unión a antígeno de una región variable de cadena ligera y una porción de unión a antígeno de una región variable de cadena pesada, *por ejemplo*, los dos dominios del fragmento Fv, VLC y VHC, se pueden unir, mediante procedimientos recombinantes, a través de un conector sintético que les permite formarse como una cadena de proteínas única en la que las regiones VLC y VHC se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como cadena simple Fv (scFv); véanse, *por ejemplo*, Bird y col., Science 242:423-426 (1988); y Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:5879-5883 (1988)). Tales scFv pueden ser un agente diana de la presente invención y son abarcados por el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo.

Un fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación no covalente y fuerte. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Si bien seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno, incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprende solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una afinidad menor que todo el sitio de unión. Para mejorar la estabilidad, los dominios V_H-V_L pueden estar conectados por un conector peptídico flexible como (Gly₄Ser)₃ para formar un fragmento de anticuerpo Fv o scFv monocatenario o puede diseñarse para formar un enlace disulfuro mediante la introducción de dos residuos de cisteína en las regiones de estructura para producir un Fv estabilizado con disulfuro (dsFv).

Como se señaló, otros formatos de anticuerpos útiles incluyen diacuerpos, minicuerpos y anticuerpos biespecíficos. Un diacuerpo es un homodímero de scFv enlazados covalentemente por un conector peptídico corto (de aproximadamente 5 aminoácidos o menos). Al usar un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma cadena, los dominios pueden verse obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno (véase, *por ejemplo*, los documentos EP 404,097 y WO 93/11161 para obtener información adicional sobre diacuerpos). Una variante de diacuerpo (dsFv)₂ o un anticuerpo lineal útil en las presentes composiciones y procedimientos incluye un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) que forman un par de regiones de unión a antígeno (véase, *por ejemplo*, Zapata y col., Prot. Eng. 8:1057 (1995)). Los minicuerpos útiles son homodímeros de proteínas de fusión scFv-C_{H3}. En la variante de minicuerpo, el minicuerpo Flex, el scFv está fusionado con la región bisagra de IgG1, que, a su vez, está enlazada a la región C_{H3} mediante un conector de 10 aminoácidos.

También se puede usar un anticuerpo biespecífico, que reconoce dos epítopos diferentes, siempre que un brazo se una específicamente a sEcad como se describe en esta invención. Se ha desarrollado una variedad de diferentes formatos de anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos útiles pueden ser cuadromas, es decir, un anticuerpo intacto en el que cada par H-L se deriva de un anticuerpo diferente. Típicamente, los cuadromas se producen mediante la fusión de dos hibridomas de células B diferentes, lo cual es seguido por la detección de las llamadas fusionadas para seleccionar aquellos que han mantenido la expresión de ambos conjuntos de genes de inmunoglobulina del clonotipo. Alternativamente, un anticuerpo biespecífico puede ser un anticuerpo recombinante. Los formatos ejemplares para anticuerpos biespecíficos incluyen, entre otros, scFv en tándem en los que dos cadenas individuales de diferente especificidad están conectadas a través de un conector peptídico; diacuerpos y diacuerpos monocatenarios.

Los fragmentos de anticuerpos son adecuados para su uso siempre que retengan la especificidad deseada del anticuerpo de longitud completa y/o la especificidad suficiente para inhibir la supervivencia, la proliferación o la metástasis de las células cancerosas. Por consiguiente, un fragmento de un anticuerpo anti-sEcad, como se describe en esta invención, puede retener la capacidad del anticuerpo intacto para unirse a los subdominios mencionados. Estas porciones de anticuerpos pueden obtenerse usando técnicas convencionales conocidas por un experto en la materia, y las porciones pueden seleccionarse para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos se seleccionan como agentes anticancerosos.

Los procedimientos para preparar fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica y abarcan tanto procedimientos bioquímicos (por ejemplo, digestión proteolítica de anticuerpos intactos que pueden ser seguidos por reticulación química) como procedimientos basados en ADN recombinante en los que las secuencias de inmunoglobulina están genéticamente modificadas para dirigir la síntesis de los fragmentos deseados. Los ejemplos de procedimientos bioquímicos se describen en las Patentes de los EE.UU. No. 5.855.866; 5.877.289; 5.965.132; 6.093.399; 6.261.535; y 6.004.555. Los ácidos nucleicos que codifican una cadena quimérica o humanizada se pueden expresar para producir un polipéptido contiguo. Véase, *por ejemplo*, Cabilly y col., Patente de los EE.UU. No. 4.816.567; Cabilly y col., Patente europea No. 0.125.023 B1; Boss y col., Patente de los EE.UU. No. 4.816.397; Boss y col., Patente europea No. 0.120.694 B1; Neuberger y col., WO 86/01533; Neuberger y col., Patente europea No. 0.194.276 B1; Winter, Patente de los EE.UU. No. 5.225.539; y Winter, Patente europea No. 0.239.400 B1. Véase también, Newman y col., BioTechnology 10:1455-1460 (1992), con respecto a los anticuerpos injertados con CDR y Ladner y col. (Patente de los EE.UU. No. 4.946.778) y Bird y col., Science 242:423-426 (1988)) con respecto a los anticuerpos monocatenarios.

Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener por medio de la proteólisis de la inmunoglobulina completa por la tiolproteasa no específica, la papaína. La digestión con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados "fragmentos Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno y un "fragmento Fc" residual. Las diversas fracciones se pueden separar mediante una cromatografía en proteína A-Sepharose o una cromatografía de intercambio iónico. El procedimiento habitual para la preparación de fragmentos F(ab')₂ de IgG de origen humano y de conejo es la proteólisis limitada por la enzima pepsina. El tratamiento con pepsina de anticuerpos intactos proporciona un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígenos y aun así es capaz de reticular el antígeno. Un fragmento Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio de cadena pesada CH1 que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

También se describen procedimientos para hacer un agente de orientación (*por ejemplo*, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno u otra variante del mismo) que se dirige a la sEcad, *por ejemplo*, uniéndose específicamente al segundo, tercer, cuarto o quinto subdominio de la sEcad (o a un epítipo que incluye residuos de aminoácidos en dos o más de estos subdominios). Por ejemplo, se pueden construir regiones variables usando procedimientos de mutagénesis por PCR para alterar las secuencias de ADN que codifican una cadena de inmunoglobulina (*por ejemplo*, usando procedimientos empleados para generar inmunoglobulinas humanizadas; véase, *por ejemplo*, Kanunan y col., Nucl. Acids Res. 17:5404 (1989); Sato y col., Cancer Research 53:851-856 (1993); Daugherty y col., Nucleic Acids Res. 19(9):2471-2476 (1991); y Lewis y Crowe, Gene 101:297-302 (1991)). Usando estos u otros procedimientos adecuados, las variantes también se pueden producir fácilmente. Por ejemplo, las regiones variables clonadas pueden mutagenizarse, y las secuencias que codifican variantes con la especificidad deseada pueden seleccionarse (*por ejemplo*, de una biblioteca de fagos; véase, *por ejemplo*, Krebber y col., Patente de los EE.UU. No. 5.514.548; y Hoogenboom y col., WO 93/06213).

Otros procedimientos adecuados para producir o aislar inmunoglobulinas que reconocen específicamente una diana celular como se describe en esta invención incluyen, *por ejemplo*, procedimientos que se basan en la inmunización de animales transgénicos (*por ejemplo*, ratones) capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos (véase, *por ejemplo*, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:2551-2555 (1993); Jakobovits y col., Nature 362:255-258 (1993); Lonberg y col., EE.UU. EE.UU. No. 5.545.806; y Surani y col., Patente de los EE.UU. No. 5.545.807).

Como es bien sabido en la técnica, los anticuerpos monoclonales son anticuerpos homogéneos de especificidad antigénica idéntica, producidos por un solo clon de células productoras de anticuerpos, y los anticuerpos policlonales generalmente reconocen diferentes epítopos en el mismo antígeno y son producidos por más de un clon de células productoras de anticuerpos. Cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador, monoclonal, indica el carácter de que el anticuerpo se obtuvo a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo a través de ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante el procedimiento de hibridoma descrito primero por Kohler y col., (Nature 256:495 (1975))) o por procedimientos de ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, la Patente de los EE.UU. No. 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en Clackson y col. (Nature 352:624-628 (1991)) y Marks y col., (J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)), *por ejemplo*.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden incluir anticuerpos quiméricos, es decir, anticuerpos que típicamente tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular, o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como también a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de los EE.UU. No. 4.816.567; y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés incluyen anticuerpos primatizados que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, simios, monos del Viejo Mundo, monos del Nuevo Mundo, prosimios) y secuencias de la región constante humana.

Varios procedimientos para generar anticuerpos monoclonales (mAb) son bien conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, los procedimientos descritos en la Patente de los EE.UU. No. 4.196.265. Las técnicas de generación de anticuerpos monoclonales más estándares generalmente comienzan en la misma línea que aquellas para preparar anticuerpos policlonales (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)). Típicamente, un animal adecuado puede inmunizarse con un inmunógeno seleccionado para estimular las células productoras de anticuerpos. Los roedores como los ratones y las ratas son animales ejemplares, aunque también se pueden usar conejos, ovejas, ranas y pollos. Los ratones pueden ser particularmente útiles (*por ejemplo*, los ratones BALB/c se usan rutinariamente y, por lo general, dan un mayor porcentaje de fusiones estables).

Después de la inmunización, las células somáticas con el potencial de producir los anticuerpos deseados, específicamente los linfocitos B (células B), pueden seleccionarse para su uso en la generación de MAb y la fusión con células de una célula de mieloma inmortal, generalmente una de la misma especie que el animal que fue inmunizado. Las líneas celulares de mieloma adecuadas para su uso en procedimientos de fusión para producir hibridomas típicamente no producen anticuerpos, tienen una eficiencia de fusión alta y deficiencias enzimáticas que, a continuación, se vuelven incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que permiten el crecimiento de las células fusionadas deseadas solamente (hibridomas). Se puede usar cualquiera de varias células de mieloma, como saben los expertos en la materia. Por ejemplo, cuando el animal inmunizado es un ratón, uno puede usar P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; para las ratas, se puede usar R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F, 4B210 o una de las líneas celulares de ratón mencionadas anteriormente. Tanto U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 como UC729-6 pueden ser útiles en conexión con fusiones de células humanas.

Este cultivo puede proporcionar una población de hibridomas a partir de los cuales se pueden seleccionar hibridomas específicos, lo cual es seguido por una dilución en serie y la clonación en líneas productoras de anticuerpos individuales, que se pueden propagar indefinidamente para la producción de anticuerpos.

Los procedimientos para producir anticuerpos monoclonales pueden incluir etapas de purificación. Por ejemplo, los anticuerpos generalmente pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, usando filtración, centrifugación y diversos procedimientos cromatográficos, tales como HPLC o cromatografía de afinidad, todas las cuales son técnicas bien conocidas por un experto en la materia. Cada una de estas técnicas de purificación implica el fraccionamiento para separar el anticuerpo deseado de otros componentes de una mezcla. Los procedimientos analíticos particularmente adecuados para la preparación de anticuerpos incluyen, por ejemplo, la cromatografía en proteína A-Sepharose y/o proteína G-Sepharose.

Los anticuerpos anti-sEcad de la invención pueden incluir CDR de una fuente humana o no humana. Los anticuerpos "humanizados" son generalmente anticuerpos monoclonales quiméricos o mutantes de ratón, rata, hámster, conejo u otras especies, que poseen dominios de regiones variables y/o constantes humanas o cambios específicos. Las técnicas para generar un denominado anticuerpo "humanizado" son bien conocidas por los expertos en la materia.

La estructura de la inmunoglobulina puede ser humana, humanizada o no humana (*por ejemplo*, una estructura murina modificada para disminuir la antigenicidad en humanos) o una estructura sintética (*por ejemplo*, una secuencia de consenso). Las inmunoglobulinas humanizadas son aquellas en las que los residuos de la estructura corresponden a las secuencias de la línea germinal humana y las CDR resultan de la recombinación V(D)J y las mutaciones somáticas. Sin embargo, las inmunoglobulinas humanizadas también pueden comprender residuos de aminoácidos no codificados en secuencias de ácido nucleico de inmunoglobulina de línea germinal humana (*por ejemplo*, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *ex vivo*). Se ha demostrado que la mutación somática *in vivo* de genes variables humanos da como resultado la mutación de los residuos de la estructura (véase Nature Immunol. 2:537 (2001)). Dicho anticuerpo se denominaría "humano" dada su fuente, a pesar de las mutaciones de estructura. Los dominios variables de anticuerpos de ratón también contienen mutaciones somáticas en residuos de

estructura (véase Sem. Immunol. 8:159 (1996)). Por tanto, los ratones transgénicos que contienen el locus de Ig humano producen inmunoglobulinas que comúnmente se conocen como "completamente humanas", a pesar de que poseen un promedio de 4,5 mutaciones de estructura (Nature Genet. 15:146-56 (1997)). Por lo tanto, el uso aceptado indica que un gen de dominio variable de un anticuerpo basado en la secuencia de la línea germinal, pero que posee 5 mutaciones de estructura introducidas, por ejemplo, por un procedimiento mutacional somático *in vivo* se denomina "humano".

Los anticuerpos humanizados se pueden diseñar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo: (1) injertar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas en una estructura humana y una región constante (un procedimiento denominado en la técnica como humanizante) o, de manera alternativa, (2) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero proporcionándoles una superficie similar a la humana mediante el reemplazo de residuos superficiales (un procedimiento denominado en la técnica como recubrimiento). Los anticuerpos humanizados pueden incluir tanto anticuerpos humanizados como recubiertos. De manera similar, los anticuerpos humanos se pueden producir mediante la introducción de locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, *por ejemplo*, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado total o parcialmente. Ante exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos que se asemejan en gran medida a lo que se observa en humanos en todo respecto, lo que incluye el reordenamiento de genes, el arreglo y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y col., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg y col., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild y col., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995); Jones y col., Nature 321:522-525 (1986); Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyer y col., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169-217 (1994); y Kettleborough, C. A. y col., Protein Eng. 4(7):773-83 (1991)).

Además de los anticuerpos quiméricos y humanizados, pueden derivarse anticuerpos completamente humanos de ratones transgénicos que tienen genes de inmunoglobulina humana (véase, *por ejemplo*, las Patentes de los EE.UU. No. 6.075.181; 6.091.001; y 6.114.598), o de bibliotecas de exhibición de fagos de genes de inmunoglobulina humana (véase, *por ejemplo*, McCafferty y col., Nature 348:552-554 (1990); Clackson y col., Nature 352:624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)). En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden producirse e identificarse mediante bibliotecas de presentación de fagos de scFv usando procedimientos estándares conocidos en la técnica.

Los anticuerpos anti-sEcad pueden modificarse para modular su afinidad de unión al antígeno, sus funciones efectoras o su farmacocinética. En particular, se pueden hacer mutaciones aleatorias en las CDR y los productos seleccionados para identificar anticuerpos con afinidades más altas y/o especificidades más altas. Dicha mutagénesis y selección se practica habitualmente en las técnicas de anticuerpos. Una forma conveniente de generar tales variantes de sustitución es la maduración por afinidad usando una expresión en fago.

Las tecnologías de barajamiento e implantación de CDR pueden usarse con los anticuerpos proporcionados en esta invención, por ejemplo. La reproducción aleatoria de CDR inserta secuencias de CDR en una región de estructura específica (Jirholt y col., Gene 215:471 (1988)). Las técnicas de implantación de CDR permiten la combinación aleatoria de secuencias de CDR en una sola estructura maestra (Soderlind y col., Immunotechnol. 4:279 (1999); y Soderlind y col., Nature Biotechnol. 18:852 (2000)). Usando dichas técnicas, las secuencias CDR del anticuerpo anti-sEcad, por ejemplo, pueden mutagenizarse para crear una pluralidad de secuencias diferentes, que pueden incorporarse en una secuencia de andamio y las variantes de anticuerpos resultantes pueden seleccionarse según las características deseadas, *por ejemplo*, mayor afinidad. En algunas realizaciones, las secuencias del anticuerpo anti-sEcad pueden examinarse para detectar la presencia de epítomos de células T, como se conoce en la técnica. La secuencia subyacente se puede cambiar para eliminar los epítomos de células T, es decir, para "desinmunizar" el anticuerpo.

La tecnología recombinante que usa, por ejemplo, la tecnología de fagémidos, permite la preparación de anticuerpos que tienen una especificidad deseada a partir de genes recombinantes que codifican una gama de anticuerpos. Ciertas técnicas recombinantes implican el aislamiento de genes de anticuerpos mediante la detección inmunológica de bibliotecas de expresión de fago de inmunoglobulina combinatoria preparadas a partir de ARN aislado del bazo de un animal inmunizado (Morrison y col., Mt. Sinai J. Med. 53:175 (1986); Winter y Milstein, Nature 349:293 (1991); Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:4457 (1992)). Para tales procedimientos, se pueden preparar bibliotecas combinatorias de fagémidos de inmunoglobulina a partir de ARN aislado del bazo de un animal inmunizado, y se pueden seleccionar fagémidos que expresan anticuerpos adecuados mediante barrido usando células que expresan

antígenos y células de control. La ventaja de este enfoque sobre las técnicas convencionales de hibridoma incluye aproximadamente 10^4 veces tantos anticuerpos como se puedan producir y seleccionar en una sola ronda, y el hecho de que es posible generar nuevas especificidades mediante la combinación de cadenas H y L, lo que puede aumentar aún más el porcentaje de anticuerpos adecuados generados.

5

Un procedimiento para la generación de un gran repertorio de diversas moléculas de anticuerpos en bacterias utiliza el bacteriófago lambda como vector (Huse y col., Science 246:1275 (1989)). La producción de anticuerpos usando el vector lambda implica la clonación de poblaciones de secuencias de ADN de cadena pesada y ligera en vectores de partida separados. Los vectores posteriormente se pueden combinar aleatoriamente para formar un vector único que dirige la coexpresión de cadenas pesadas y ligeras para formar fragmentos de anticuerpos. Se describe la técnica general para la presentación de fagos filamentosos (Patente de los EE.UU. No. 5.658.727). En el sentido más general, el procedimiento proporciona un sistema para la clonación y detección simultánea de especificidades de unión a ligando preseleccionadas de repertorios de genes de anticuerpos usando un sistema de vector único. La detección de miembros aislados de la biblioteca para una capacidad de unión a ligando preseleccionada permite la correlación de la capacidad de unión de una molécula de anticuerpo expresada con un medio conveniente para aislar un gen que codifica el miembro de la biblioteca. Se describen procedimientos adicionales para detectar bibliotecas de fagémidos (Patentes de los EE.UU. No. 5.580.717, 5.427.908, 5.403.484 y 5.223.409).

Un procedimiento para la generación y detección de grandes bibliotecas de sitios de combinación de anticuerpos total o parcialmente sintéticos, o parátomos, utiliza vectores de visualización derivados de fagos filamentosos como M13, fl o fd (Patente de los EE.UU. No. 5.698.426). Los vectores de visualización de fagos filamentosos, denominados "fagémidos", producen grandes bibliotecas de anticuerpos monoclonales que tienen inmunoespecificidades diversas y novedosas. La tecnología usa un dominio de anclaje de membrana de proteína de cubierta de fago filamentosos como un medio para unir el producto genético y el gen durante la etapa de ensamblaje de la replicación de fagos filamentosos, y se ha usado para la clonación y expresión de anticuerpos de bibliotecas combinatorias (Kang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 88:4363 (1991); y Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88:7978 (1991)). La biblioteca de expresión de superficie se somete a una detección en búsqueda de fragmentos Fab específicos que se unen a moléculas de neuraminidasa mediante procedimientos de aislamiento de afinidad estándar. Los fragmentos Fab seleccionados pueden caracterizarse secuenciando los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos después de la amplificación de la población de fagos.

Un procedimiento para producir diversas bibliotecas de anticuerpos y la detección de especificidades de unión deseables se describen en las Patentes de los EE.UU. No. 5.667.988 y 5.759.817). El procedimiento implica la preparación de bibliotecas de moléculas de inmunoglobulina heterodiméricas en forma de bibliotecas de fagémidos, usando oligonucleótidos degenerados y reacciones de extensión de cebadores para incorporar degeneraciones en regiones CDR de dominios variables de cadena pesada y ligera variables de inmunoglobulina, y la visualización de polipéptidos mutagenizados en la superficie de la fagémido. A partir de entonces, la proteína de visualización se selecciona según su capacidad de unirse a un antígeno preseleccionado. Una variación adicional de este procedimiento para producir diversas bibliotecas de anticuerpos y la detección de especificidades de unión deseables se describen en la Patente de los EE.UU. No. 5.702.892. En este procedimiento, solo se emplean secuencias de cadena pesada, las secuencias de cadena pesada se aleatorizan en todas las posiciones de nucleótidos que codifican ya sea la región hipervariable CDRI o CDRIII, y la variabilidad genética en las CDR se puede generar independientemente de cualquier procedimiento biológico.

Además de las bibliotecas combinatorias de expresión de fagos de inmunoglobulina descritas anteriormente, un enfoque de clonación molecular es preparar anticuerpos de ratones transgénicos que contienen bibliotecas de anticuerpos humanos. Dichas técnicas se describen en la (Patente de los EE.UU. No. 5.545.807). Dichos animales transgénicos pueden emplearse para producir anticuerpos humanos de un solo isotipo, más específicamente un isotipo que es esencial para la maduración de las células B, como IgM y posiblemente IgD. Otro procedimiento para producir anticuerpos humanos se describe en la Patente de los EE.UU. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; y 5.770.429, donde se describen animales transgénicos que son capaces de cambiar de un isotipo necesario para el desarrollo de células B a otros isotipos.

Las inmunoglobulinas anti-sEcad pueden modificarse para reducir o abolir la glucosilación. Una inmunoglobulina que carece de glicosilación puede ser una inmunoglobulina que no está glicosilada en absoluto; o que no está completamente glicosilada; o que está atípicamente glicosilada (*es decir*, el patrón de glucosilación para el mutante difiere del patrón de glucosilación de la inmunoglobulina de tipo salvaje correspondiente). Los polipéptidos IgG incluyen uno o más (*por ejemplo*, 1, 2 o 3 o más) mutaciones que atenúan la glucosilación, *es decir*, mutaciones que resultan en un dominio IgG CH2 que carece de glicosilación, no está completamente glicosilado o está atípicamente glicosilado. Las mutaciones del residuo de asparagina en el aminoácido 297 en la IgG1 humana es un ejemplo de dicha mutación.

La estructura del oligosacárido también puede modificarse, por ejemplo, eliminando la fracción de fusosa del glicano enlazado a N.

Los anticuerpos también pueden modificarse para aumentar su estabilidad y/o solubilidad in vivo mediante conjugación con polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol. Se puede usar cualquier procedimiento de PEGilación siempre que el anticuerpo anti-sEcad conserve la capacidad de unirse selectivamente al segundo, tercer, cuarto o quinto subdominio de sEcad.

Se puede emplear una amplia variedad de estructuras o andamios de anticuerpos/inmunoglobulinas siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que sea específica para la diana, es decir, el segundo, tercer, cuarto o quinto subdominio de la sEcad. Tales estructuras o andamios incluyen los cinco idiotipos principales de las inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de las mismas (como los descritos en otra parte de esta invención), e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, preferentemente con aspectos humanizados. Los anticuerpos individuales de cadena pesada como los identificados en camélidos son de particular interés a este respecto.

Se pueden generar anticuerpos no basados en inmunoglobulina usando andamios no inmunoglobulina en los que se pueden injertar CDR del anticuerpo sEcad. Se puede usar cualquier estructura y andamio que no sea de inmunoglobulina, conocido por los expertos en la materia, siempre que la estructura o andamio incluya una región de unión específica para la diana. Las moléculas de tipo inmunoglobulina incluyen proteínas que comparten ciertas características estructurales con las inmunoglobulinas, por ejemplo, una estructura secundaria de lámina β . Los ejemplos de estructuras o andamios que no son inmunoglobulinas incluyen, entre otros, adnectinas (fibronectina), anquirina, anticuerpos de dominio y Ablynx nv, lipocalina, inmunomedicamentos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc., Mountain View, CA), Proteína A y afilina (gamma-cristalina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

Los anticuerpos anti-sEcad de la invención se unen específicamente a un epítipo en el segundo, tercer, cuarto o quinto subdominio de sEcad (pero no a un epítipo de EC1). Un epítipo se refiere a un determinante antigénico en una diana que está unido específicamente por el parátipo, es decir, el sitio de unión de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos consisten generalmente en agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como cadenas laterales de azúcar o aminoácidos y típicamente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como también características de carga específicas. Los epítipos generalmente tienen entre aproximadamente 4 y alrededor de 10 aminoácidos contiguos (un epítipo continuo), o alternativamente pueden ser un conjunto de aminoácidos no contiguos que definen una estructura particular (por ejemplo, un epítipo conformacional). Por consiguiente, un epítipo puede consistir en al menos 4, 6, 8, 10 y 12 de tales aminoácidos. En la técnica, se conocen procedimientos para determinar la conformación espacial de los aminoácidos y estos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional.

Los procedimientos para predecir otros epítipos potenciales a los que se puede unir un anticuerpo son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, entre otros, el Análisis Kyte-Doolittle (Kyte y Doolittle, J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982)), el Análisis de Hopp y Woods (Hopp y Woods, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78:3824-3828 (1981)); Hopp y Woods, Mol. Immunol 20:483-489 (1983); Hopp, J. Immunol. Methods 88:1-18 (1986)), el Análisis Jameson-Wolf (Jameson y Wolf Comput. Appl. Biosci. 4:181-186 (1988)), y el Emini Analysis (Emini y col., Virology 140:13-20 (1985)). Los epítipos potenciales pueden identificarse determinando dominios extracelulares teóricos. Es posible usar algoritmos de análisis como TMpred (véase Hofmann y Stoffel, Biol. Chem 374:166 (1993)) o TMHMM (Krogh y col., J. Mol. Biol., 305(3):567-580 (2001)) para hacer tales predicciones. Otros algoritmos, como SignalP 3.0 (Bednsten y col., J. Mol. Biol. 340 (4):783-795 (2004)), se pueden usar para predecir la presencia de péptidos señal y para predecir dónde se separarían esos péptidos de la proteína de longitud completa. Las porciones de las proteínas en el exterior de la célula pueden servir como dianas para la interacción de anticuerpos.

Las composiciones de la presente invención incluyen anticuerpos que (1) exhiben un nivel umbral de actividad de unión; y/o (2) no reaccionan significativamente de forma cruzada con moléculas de polipéptidos relacionadas conocidas. La afinidad de unión de un anticuerpo puede ser determinada fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660-672 (1949)).

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-sEcad pueden unirse a sus epítipos diana o señuelos miméticos al menos 1,5, 2, 5, 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 veces o más para el segundo, tercer, cuarto o quinto subdominio diana de la sEcad, que a otras proteínas de las cuales se predice que tienen alguna homología con el segundo, tercer, cuarto o quinto subdominio de la sEcad.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-sEcad se unen con una alta afinidad de 10^{-4} M o menos, 10^{-7} M o menos, 10^{-9} M o menos o con una afinidad subnanomolar (0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 nM o incluso menos). En algunas realizaciones, la afinidad de unión de los anticuerpos para el segundo, tercer, cuarto o quinto subdominio de la sEcad es al menos 1×10^6 Ka. En algunas realizaciones, la afinidad de unión de los anticuerpos para el segundo, 5 tercer, cuarto o quinto subdominio de la sEcad es al menos 5×10^6 Ka, 1×10^7 Ka, 2×10^7 Ka, 1×10^8 Ka o mayor. Los anticuerpos también se pueden describir o especificar en términos de su afinidad de unión al segundo, tercer, cuarto o quinto subdominio de la sEcad. En algunas realizaciones, las afinidades de unión incluyen aquellas con un Kd inferior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-3} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 10 5×10^{-15} M, 10^{-15} M o menor.

En algunas realizaciones, los anticuerpos no se unen a moléculas de polipéptidos relacionados conocidos; por ejemplo, se unen al segundo, tercer, cuarto o quinto subdominio de un polipéptido sEcad, pero no se conocen polipéptidos relacionados. Los anticuerpos pueden seleccionarse contrastándolos con los polipéptidos relacionados conocidos para 15 aislar una población de anticuerpos que se une específicamente al segundo, tercer, cuarto o quinto subdominio de un polipéptido sEcad. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para el segundo, tercer, cuarto o quinto subdominio de un polipéptido sEcad fluirán a través de una columna que comprende el segundo, tercer, cuarto o quinto subdominio de proteínas relacionadas con el polipéptido sEcad (con la excepción de segundo, tercero, cuarto o quinto subdominio de un polipéptido sEcad) adherido a la matriz insoluble en condiciones de tampón adecuadas. Tal detección permite el 20 aislamiento de anticuerpos policlonales y monoclonales no reactivos cruzados a polipéptidos estrechamente relacionados (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current so Protocols in Immunology, Cooligan y col. (Ed.), National Institutes of Health, John Wiley y Sons, Inc., 1995). La detección y el aislamiento de anticuerpos específicos es conocida en la técnica (véase Fundamental Immunology, Paul (Ed.), Raven Press, 1993; Getzoff y col., Adv. in Immunol. 43:1-98 (1988); Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J. W. (Ed.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin y col., Ann. Rev. Immunol. 2:67-101, 1984). Los 25 ejemplos representativos de tales ensayos incluyen: inmunoelectroforesis concurrente, radioinmunoensayo (RIA), radioinmunoprecipitación, ensayo de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA), ensayo de transferencia de puntos o western blotting, ensayo de inhibición o competencia, y ensayo sándwich.

30 La capacidad de un anticuerpo particular para matar selectivamente células malignas que expresan cadherina-E puede evaluarse usando, por ejemplo, los procedimientos descritos en los Ejemplos de esta invención.

Los anticuerpos anti-sEcad pueden incluir una etiqueta, que también puede denominarse indicador o marcador (*por ejemplo*, un marcador detectable). Un marcador detectable puede ser cualquier molécula que esté enlazada 35 covalentemente al anticuerpo anti-sEcad o un fragmento biológicamente activo del mismo que permita la evaluación cualitativa y/o cuantitativa de la expresión o actividad del péptido marcado. La actividad puede incluir una actividad biológica, una actividad fisicoquímica o una combinación de las mismas. Tanto la forma como la posición del marcador detectable pueden variar, siempre que el anticuerpo marcado retenga la actividad biológica. Se pueden usar muchos marcadores diferentes, y la elección de un marcador particular dependerá de la aplicación deseada. Los anticuerpos 40 anti-sEcad etiquetados pueden usarse, por ejemplo, para evaluar los niveles de sEcad en una muestra biológica, *por ejemplo*, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre o una muestra de biopsia o para evaluar la respuesta clínica a la terapia de péptidos sEcad.

Los marcadores adecuados incluyen, por ejemplo, enzimas, ligandos de fotoafinidad, radioisótopos y compuestos 45 fluorescentes o quimioluminiscentes. Los procedimientos para introducir marcadores detectables en péptidos son bien conocidos en la técnica. Se pueden agregar marcadores durante la síntesis o posteriormente de manera sintética. Los anticuerpos anti-sEcad recombinantes o sus variantes biológicamente activas también pueden marcarse mediante la adición de precursores marcados (*por ejemplo*, aminoácidos radiomarcados) al medio de cultivo en el que crecen las células transformadas. En algunas realizaciones, se pueden usar análogos o variantes de péptidos para facilitar la 50 incorporación de marcadores detectables. Por ejemplo, cualquier residuo de fenilalanina de extremo terminal N se puede reemplazar con un aminoácido aromático estrechamente relacionado, como la tirosina, que se puede marcar fácilmente con 125 I. En algunas realizaciones, se pueden agregar grupos funcionales adicionales que soportan un marcado efectivo a los fragmentos de un anticuerpo anti-sEcad o variantes biológicamente activas del mismo. Por ejemplo, se puede agregar un grupo 3-tributiltintinbenzoilo al extremo terminal N de la estructura nativa; el 55 desplazamiento posterior del grupo tributilestaño con 125 I generará un grupo de yodobenzoilo radiomarcado.

Los procedimientos también pueden llevarse a cabo mediante la administración de una proteína que provoca la producción de anticuerpos anti-sEcad *in vivo*. En consecuencia, las composiciones descritas incluyen fragmentos 60 antigénicos del dominio extracelular de cadherina-E en los subdominios EC2-EC5 (véanse las fig. 1A y fig. 1B). Estos polipéptidos pueden fusionarse con un polipéptido heterólogo para generar una proteína de fusión inmunogénica. Por

ejemplo, un polipéptido sEcad puede fusionarse con un fragmento de la proteína hemaglutinina HA2 del virus de la influenza, como se describe en la Patente de los EE.UU. No. 7.262.270.

También se describen ácidos nucleicos que pueden usarse para inhibir la expresión de la cadherina-E (*por ejemplo*, un oligonucleótido antisentido o un oligonucleótido que media la interferencia de ARN). Las construcciones de ácido nucleico también se pueden usar para expresar fragmentos antigénicos de sEcad *in vivo* o *ex vivo* (*por ejemplo*, en el cultivo celular o tisular).

Los términos "ácido nucleico"; y "polinucleótido"; pueden usarse indistintamente en esta invención, y se refieren tanto al ARN como al ADN, incluyendo el ADNc, el ADN genómico, el ADN sintético y el ADN (o ARN) que contienen análogos de ácido nucleico. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional. Un ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario (*es decir*, un hilo sensorial o un hilo antisentido). Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen genes, fragmentos de genes, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm) y porciones de los mismos, ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARNip, micro ARN, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores, así como también análogos de ácido nucleico. En el contexto de la presente invención, los ácidos nucleicos pueden codificar, por ejemplo, un anticuerpo, un anticuerpo mutante o un fragmento del mismo o una sEcad o un fragmento de la misma.

Un ácido nucleico "aislado" puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN natural o un fragmento de la misma, siempre que al menos una de las secuencias de ácido nucleico que normalmente se encuentra inmediatamente flanqueando esa molécula de ADN en un genoma natural se elimine o esté ausente. Por consiguiente, un ácido nucleico aislado incluye, entre otros, una molécula de ADN que existe como una molécula separada, independiente de otras secuencias (*por ejemplo*, un ácido nucleico sintetizado químicamente, o un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el tratamiento de endonucleasa de restricción). Un ácido nucleico aislado también se refiere a una molécula de ADN que se incorpora a un vector, un plásmido de replicación autónoma, un virus o al ADN genómico de un procarionte o eucarionte. Además, un ácido nucleico aislado puede incluir un ácido nucleico modificado genéticamente, como una molécula de ADN que forma parte de un ácido nucleico híbrido o de fusión. Un ácido nucleico existente entre muchos (*por ejemplo*, docenas, cientos o millones) de otros ácidos nucleicos dentro de, por ejemplo, bibliotecas de ADNc o bibliotecas genómicas, o rodajas de gel que contienen una solución de digestión de restricción de ADN genómico, no es un ácido nucleico aislado.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas se pueden producir mediante técnicas estándares. Por ejemplo, las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden usar para obtener un ácido nucleico aislado que contiene una secuencia de nucleótidos descrita en esta invención, incluyendo las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido descrito en esta invención (*es decir*, una proteína diseñada). La PCR se puede usar para amplificar secuencias específicas de ADN y ARN, incluyendo las secuencias de ADN genómico total o ARN celular total. Se describen varios procedimientos de PCR en, por ejemplo, PCR Primer: A Laboratory Manual, Dieffenbach y Dveksler, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Generalmente, la información de secuencia de los extremos de la región de interés, o más allá, se emplea para diseñar cebadores oligonucleotídicos que son idénticos o similares en secuencia a las cadenas opuestas de la plantilla a amplificar. También se encuentran disponibles varias estrategias de PCR mediante las cuales se pueden introducir modificaciones en la secuencia de nucleótidos específicos del sitio en un ácido nucleico molde (como uno puede desear, por ejemplo, al hacer una proteína modificada, por ejemplo, un anticuerpo, un anticuerpo mutante o un fragmento del mismo, o una proteína de fusión o un fragmento de la misma). Los ácidos nucleicos aislados también pueden sintetizarse químicamente, ya sea como una sola molécula de ácido nucleico (*por ejemplo*, usando una síntesis de ADN automatizada en la dirección 3' a la 5' usando tecnología de fosforamidita) o como una serie de oligonucleótidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar uno o más pares de oligonucleótidos largos (*por ejemplo*, > 50 a 100 nucleótidos) que contienen la secuencia deseada, con cada par que contiene un segmento corto de complementariedad (*por ejemplo*, aproximadamente 15 nucleótidos) de modo tal que se forma un dúplex cuando el par de oligonucleótidos se reúne. La polimerasa de ADN se usa para extender los oligonucleótidos, lo que da como resultado una molécula de ácido nucleico bicatenario por par de oligonucleótidos, que, a continuación, puede ligarse en un vector. Los ácidos nucleicos aislados también pueden obtenerse mediante la mutagénesis de, por ejemplo, una porción de ocurrencia natural de un ADN que codifica proteínas diseñadas.

A los ácidos nucleicos y los polipéptidos descritos (*por ejemplo*, los fragmentos antigénicos de sEcad) se puede hacer referencia como "exógenos". El término "exógeno" indica que el ácido nucleico o el polipéptido es parte de, o es codificado por, una construcción de ácido nucleico recombinante, o no está en su entorno natural. Por ejemplo, un ácido nucleico exógeno puede ser una secuencia de una especie introducida en otra especie, *es decir*, un ácido nucleico heterólogo. Típicamente, dicho ácido nucleico exógeno se introduce en las otras especies *por medio* de una construcción de ácido nucleico recombinante. Un ácido nucleico exógeno también puede ser una secuencia nativa de

un organismo y que ha sido reintroducida en las células de ese organismo. Un ácido nucleico exógeno que incluye una secuencia nativa puede distinguirse a menudo de la secuencia de ocurrencia natural mediante la presencia de secuencias no naturales enlazadas al ácido nucleico exógeno, *por ejemplo*, secuencias reguladoras no nativas que flanquean una secuencia nativa en una construcción de ácido nucleico recombinante. Además, ácidos nucleicos exógenos transformados de manera estable típicamente se integran en posiciones que no son la posición donde se encuentra la secuencia nativa.

También se describen las construcciones recombinantes y las mismas se pueden usar para transformar células, a fin de expresar un polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo, un anticuerpo mutante o un fragmento del mismo, o una sEcad o un fragmento de la misma. Una construcción de ácido nucleico recombinante comprende un ácido nucleico que codifica, por ejemplo, un anticuerpo, un anticuerpo mutante o un fragmento del mismo, o una sEcad o un fragmento de la misma, como se describe en esta invención, enlazado(a) operativamente a una región reguladora adecuada para expresar la proteína modificada, por ejemplo, un anticuerpo, un anticuerpo mutante o un fragmento del mismo, o una sEcad o un fragmento de la misma. En algunos casos, una construcción de ácido nucleico recombinante puede incluir un ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación, un gen o un fragmento de una secuencia de codificación o gen en una orientación antisentido, de modo tal que se transcriba la cadena antisentido de ARN. Se apreciará que varios ácidos nucleicos pueden codificar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos particular. La degeneración del código genético es bien conocida en la técnica. Para muchos aminoácidos, hay más de un triplete de nucleótidos que sirve como codón para el aminoácido. Por ejemplo, los codones en la secuencia de codificación para un fragmento dado de un anticuerpo, un anticuerpo mutante o un fragmento del mismo, o una proteína de fusión o un fragmento del mismo pueden modificarse de modo tal que se obtenga la expresión óptima en un organismo particular, usando tablas de sesgo de codón adecuadas para ese organismo.

Se describen vectores que contienen ácidos nucleicos. Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, en el que se puede insertar otro segmento de ADN para producir la replicación del segmento insertado. Los vectores de expresión incluyen vectores plasmídicos, vectores virales y las partículas de amplicón de HSV, como se describe en la Publicación de la Solicitud de los EE.UU. No. 2006/0239970.

Generalmente, un vector es capaz de replicarse cuando está asociado a los elementos de control adecuados. Los esqueletos de vectores adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos usados habitualmente en la técnica, tales como plásmidos, virus, cromosomas artificiales, BAC, YAC o PAC. El término "vector" incluye vectores de clonación y expresión, así como también vectores virales y vectores integradores. Un "vector de expresión" es un vector que incluye una región reguladora. Los vectores de expresión adecuados incluyen, entre otros, plásmidos y vectores virales derivados de, por ejemplo, bacteriófagos, baculovirus y retrovirus. Numerosos vectores y sistemas de expresión están disponibles comercialmente de corporaciones como Novagen (Madison, WI), Clontech (Palo Alto, CA), Stratagene (La Jolla, CA) e Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA).

Los vectores también pueden incluir, por ejemplo, orígenes de replicación, regiones de unión al andamio (SAR) y/o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable en una célula huésped. Por ejemplo, un marcador puede conferir resistencia a biocidas, como la resistencia a un antibiótico (*por ejemplo*, kanamicina, G418, bleomicina o higromicina). Como se señaló anteriormente, un vector de expresión puede incluir una secuencia de etiqueta diseñada para facilitar la manipulación o detección (*por ejemplo*, la purificación o la localización) del polipéptido expresado. Las secuencias de etiqueta, como la proteína verde fluorescente (GFP), la glutatión S-transferasa (GST), la polihistidina, la c-myc, la hemaglutinina o las secuencias de etiqueta FlagTM (Kodak, New Haven, CT) se expresan típicamente como una fusión con el polipéptido codificado. Dichas etiquetas pueden insertarse en cualquier lugar dentro del polipéptido, incluso en el extremo carboxilo o amino.

El vector también puede incluir una región reguladora. El término "región reguladora"; se refiere a secuencias de nucleótidos que influyen en el inicio y la velocidad de la transcripción o traducción, y la estabilidad y/o movilidad de un producto de transcripción o traducción. Las regiones reguladoras incluyen, entre otros, secuencias promotoras, secuencias potenciadoras, elementos de respuesta, sitios de reconocimiento de proteínas, elementos inducibles, secuencias de unión a proteínas, regiones no traducidas (UTR) 5' y 3', sitios de comienzo de la transcripción, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación e intrones.

Como se usa en esta invención, el término "operativamente enlazado" se refiere al posicionamiento de una región reguladora y una secuencia a transcribir en un ácido nucleico para influir en la transcripción o traducción de dicha secuencia. Por ejemplo, para llevar una secuencia de codificación bajo el control de un promotor, el sitio de inicio de la traducción del marco de lectura traduccional del polipéptido se coloca típicamente entre uno y aproximadamente cincuenta nucleótidos aguas abajo del promotor. Un promotor puede, sin embargo, estar posicionado tanto como alrededor de 5000 nucleótidos aguas arriba del sitio de iniciación de la traducción o alrededor de 2000 nucleótidos

aguas arriba del sitio de comienzo de la transcripción. Un promotor típicamente comprende al menos un promotor central (basal). Un promotor también puede incluir al menos un elemento de control, tal como una secuencia potenciadora, un elemento aguas arriba o una región de activación aguas arriba (UAR, por sus siglas en inglés). La elección de los promotores que se incluirán depende de varios factores, que incluyen, entre otros, eficiencia, capacidad de selección, inducibilidad, nivel de expresión deseado y expresión preferencial de células o tejidos. Para un experto en la materia es un asunto de rutina modular la expresión de una secuencia codificadora al seleccionar y posicionar adecuadamente promotores y otras regiones reguladoras en relación con la secuencia codificadora.

También se describen células huésped. Una célula huésped puede ser, por ejemplo, una procariota, *por ejemplo*, una bacteria como la *E. coli*, o un eucariota, *por ejemplo*, una célula de levadura, un insecto o un mamífero que expresa un polipéptido descrito.

Los agentes descritos en esta invención que inhiben la sEcad pueden incluirse en composiciones farmacéuticas que son fisiológicamente aceptables (es decir, suficientemente no tóxicas para su uso en los procedimientos terapéuticos y profilácticos descritos en esta invención). En consecuencia, la invención presenta una variedad de formulaciones, que incluyen cremas tópicas (integradas en filtros solares) y parches de liberación sostenida para la administración transdérmica de inhibidores de sEcad. En otras realizaciones, la composición farmacéutica puede formularse como un enjuague oral, un gel o una emulsión, o como una solución, una suspensión o una emulsión rectal. Como será evidente para un experto en la materia, las formulaciones específicas se pueden seleccionar en función del tipo de cáncer que se está tratando. Por ejemplo, el enjuague oral, el gel o la emulsión se pueden usar para tratar los cánceres en la boca, la garganta, el esófago o el estómago, y la solución, la suspensión o la emulsión rectal se pueden usar para tratar los cánceres en el recto o el colon.

Los anticuerpos terapéuticos de la invención pueden formularse para la administración a un paciente con materiales que mejoran su estabilidad y/o proporcionan una liberación controlada o sostenida *in vivo*. En consecuencia, la invención abarca sistemas de suministro en los que un agente específico de sEcad se formula con micropartículas (*por ejemplo*, micropartículas poliméricas, como las micropartículas de polilactida-co-glicólido) o nanopartículas (*por ejemplo*, liposomas, nanopartículas de carbohidratos poliméricos, dendrímeros y nanopartículas a base de carbono).

Otras formulaciones incluyen aquellas para administración subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial o pulmonar. Como se señaló, también se pueden fabricar y usar implantes de liberación sostenida.

Cualquiera de los procedimientos terapéuticos o profilácticos descritos puede incluir un paso para evaluar a un paciente antes del tratamiento o a medida que este último avanza. Como se señaló anteriormente, está bien documentado que la sEcad está elevada en la orina y/o el suero de pacientes con cáncer de mama, de piel, de pulmón, de próstata, gástrico y colorrectal, así como también otras neoplasias epiteliales. Según estudios anteriores sobre los niveles de sEcad, nuestros datos demuestran que la sEcad se elimina en niveles bajos de la superficie de las células epiteliales normales y en niveles mucho más altos de células de cáncer de piel humano, células de cáncer de mama humano y células de cáncer de pulmón de ratón. Por consiguiente, los procedimientos pueden incluir una etapa en la que los niveles de sEcad se determinan a partir de una muestra (*por ejemplo*, una muestra de orina o sangre) obtenida de un sujeto. Los niveles elevados son una indicación de que un sujeto es un buen candidato para el tratamiento como se describe en esta invención, y la monitorización de la sEcad a medida que avanza el tratamiento puede ayudar a optimizar la dosificación y la programación, así como también a predecir el resultado. Por ejemplo, la monitorización se puede usar para detectar el inicio de la resistencia y distinguir rápidamente a los pacientes que responden de aquellos que no. Cuando hay signos de resistencia o falta de respuesta, un médico puede elegir un agente alternativo o complementario antes de que el tumor desarrolle mecanismos de escape adicionales.

Las composiciones que comprenden dos o más agentes que se dirigen específicamente a uno o más del segundo, el tercero, el cuarto o el quinto subdominio de sEcad pueden administrarse a personas o mamíferos que padecen o tienen predisposición a sufrir cáncer. Los anticuerpos anti-sEcad también se pueden administrar con otro agente terapéutico, como un agente citotóxico o quimioterapéutico contra el cáncer. La administración concurrente de dos o más agentes terapéuticos no requiere que los agentes se administren al mismo tiempo o por la misma vía, siempre que haya una superposición en el período de tiempo durante el cual los agentes ejercen su efecto terapéutico. Se contempla la administración simultánea o secuencial, así como también la administración en diferentes días o semanas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden incluir, además de un anticuerpo dirigido a un sEcad, otro anticuerpo terapéutico (o anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos que reconocen una diana celular (o más) distinta de sEcad)). Las inmunoglobulinas ejemplares se enumeran a continuación. Cada inmunoglobulina se identifica por su nombre propio y su nombre comercial. Los números entre paréntesis que comienzan con "DB" se refieren a los identificadores para cada anticuerpo en la base de datos The DrugBank, disponible en la Universidad de

Alberta. La base de datos de DrugBank se describe en Wishart y col., Nucl. Acids Res. 36:D901-906 (2008)) en la red mundial en www.drugbank.ca. Las inmunoglobulinas útiles incluyen: Abciximab (ReoPro™) (DB00054), el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal humano-murino quimérico 7E3, cuya síntesis se describe en los documentos EP0418316 (A1) y WO 89/11538 (A1); Adalimumab (Humira™) (DB00051), un anticuerpo monoclonal completamente humano que se une al factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) y bloquea la unión del TNF-alfa a su receptor afín; alemtuzumab (Campath™) (DB00087), un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige a CD52, una proteína presente en la superficie de los linfocitos maduros, usada en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL), el linfoma cutáneo de células T (CTCL) y las células T linfoma basiliximab (Simulect™) (DB00074), un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón y humano contra la cadena alfa (CD25) del receptor de IL-2; bevacizumab (Avastin™) (DB00112) un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce y bloquea el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la señal química que estimula la angiogénesis, cuya síntesis se describe en Presta y col., Cancer Res., 57:4593-4599 (1997); certuximab (Erbix™) (DB00002), un anticuerpo monoclonal quimérico (ratón/humano) que se une e inhibe el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), cuya síntesis se describe en la Patente de los EE.UU. No. 6.217.866; certolizumab pegol (Cimzia™), un fragmento Fab' PEGilado de un anticuerpo monoclonal inhibidor de TNF humanizado; daclizumab (Zenapax™) (DB00111), un anticuerpo monoclonal humanizado contra el subconjunto alfa del receptor de IL-2; eculizumab (Soliris™), un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a la proteína del complemento C5 humano; efalizumab (Raptiva™) (DB00095), un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a CD11a; gemtuzumab (Mylotarg™) (DB00056) un anticuerpo monoclonal contra CD33 enlazado a un agente citotóxico, cuya secuencia de aminoácidos se describe en J. Immunol. 148:1149 (1991) y Caron y col., Cancer. 73(3 Suppl): 1049-1056 (1994)); ibritumomab tiuxetan (Zevalin™) (DB00078), un anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón ibritumomab junto con el quelante tiuxetan y un isótopo radiactivo (itrio⁹⁰ o indio¹¹¹); Infiximab (Remicade™) (DB00065), un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón y humano que se une al factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), cuya síntesis se describe en la Patente de los EE.UU. No. 6.015.557; muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3™), un anticuerpo monoclonal IgG2a de ratón que se une al complejo receptor de células T-CD3; natalizumab (Tysabri™) (DB00108), un anticuerpo monoclonal humanizado contra la molécula de adhesión celular integrina $\alpha 4$, cuya secuencia se describe en Leger y col., Hum. Antibodies 8(1):3-16 (1997); omalizumab (Xolair™) (DB00043), un anticuerpo monoclonal IgG1k humanizado que se une selectivamente a la inmunoglobulina E humana (IgE); palivizumab (Synagis™) (DB00110), un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG) dirigido contra un epítipo en el sitio antigénico A de la proteína F del virus respiratorio sincitial (RSV), cuya secuencia de aminoácidos se describe en Johnson y col., J. Infect. Dis. 176(5):1215-1224 (1997); panitumumab (Vectibix™), un anticuerpo monoclonal completamente humano específico para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (también conocido como receptor EGF, EGFR, ErbB-1 y HER1 en humanos); ranibizumab (Lucentis™), un fragmento de anticuerpo monoclonal anti-VEGF-A madurado por afinidad derivado del mismo anticuerpo murino original que bevacizumab (Avastin™); rituximab (Rituxan™, Mabthera™) (DB00073), un anticuerpo monoclonal quimérico contra la proteína CD20, que se encuentra principalmente en la superficie de las células B; tositumomab (Bexxar™) (DB00081), un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD20 unido covalentemente a ¹³¹I; o trastuzumab (Herceptin™) (DB00072), un anticuerpo monoclonal humanizado que se une selectivamente a la proteína HER2.

Los anticuerpos pueden incluir bioequivalentes de los anticuerpos aprobados o comercializados (biosimilares). Un biosimilar puede ser, por ejemplo, un anticuerpo actualmente conocido que tiene la misma secuencia de aminoácidos primaria que un anticuerpo comercializado, pero que puede fabricarse en un tipo celular diferente o mediante un procedimiento de producción, purificación o formulación diferente al del anticuerpo comercializado. Generalmente, se puede usar cualquier material depositado.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir o administrarse junto con un agente citotóxico, *por ejemplo*, una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen isótopos radiactivos (*por ejemplo*, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re), agentes de quimioterapia y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o toxinas sintéticas, o fragmentos de las mismas. Un agente no citotóxico se refiere a una sustancia que no inhibe o impide la función de las células y/o no causa la destrucción de las mismas. Un agente no citotóxico puede incluir un agente que puede activarse para ser citotóxico. Un agente no citotóxico puede incluir un cordón, liposoma, matriz o partícula (véase, *por ejemplo*, las Publicaciones de Patentes de los EE.UU. No. 2003/0028071 y 2003/0032995). Dichos agentes pueden conjugarse, acoplarse, enlazarse o asociarse a un anticuerpo descrito en esta invención.

Los medicamentos convencionales para el cáncer se pueden administrar con las composiciones descritas en esta invención. Los medicamentos útiles incluyen agentes antiangiogénicos, *es decir*, los agentes bloquean la capacidad de los tumores para estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos necesarios para su supervivencia. Se puede usar cualquier agente antiangiogénico conocido por los expertos en la materia, incluyendo agentes como Bevacizumab (Avastin®, Genentech, Inc.) que bloquean la función del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Otros ejemplos incluyen, entre otros, Dalteparina (Fragmin®), Suramina ABT-510, Fosfato de Combretastatina A4,

Lenalidomida, LY317615 (Enzastaurina), Isoflavona de soja (Genisteína; aislado de proteína de soja) AMG-706, Anticuerpo anti-VEGF, AZD2171, Bay 43-9006 (tosilato de sorafenib), PI-88, PTK787/ZK 222584 (Vatalanib), SU11248 (Malato de sunitinib), Trampa de VEGF, XL184, ZD6474, Talidomida, ATN-161, EMD 121974 (Cilenigítide) y Celecoxib (Celebrex®).

5

Otras terapias útiles incluyen aquellos agentes que promueven el daño del ADN, *por ejemplo*, rupturas bicatenarias en el ADN celular, en las células cancerosas. Se puede usar cualquier forma de agente que dañe el ADN que conozcan los expertos en la materia. El daño en el ADN típicamente puede ser producido por la radioterapia y/o la quimioterapia. Los ejemplos de radioterapia incluyen, entre otros, radioterapia externa y radioterapia interna (también llamada

10

braquiterapia). Las fuentes de energía para la radioterapia externa incluyen rayos X, rayos gamma y haces de partículas; las fuentes de energía usadas en la radiación interna incluyen yodo radioactivo (yodo¹²⁵ o yodo¹³¹) y de estroncio⁸⁹ o radioisótopos de fósforo, paladio, cesio, iridio, fosfato o cobalto. Los expertos en la materia conocen bien los procedimientos de administración de radioterapia.

15 Entre los ejemplos de agentes de quimioterapia que dañan el ADN se incluyen, entre otros, busulfano (Milerán), carboplatino (Paraplatino), carmustina (BCNU), clorambucilo (Leucerán), cisplatino (Platinol), ciclofosfamida (Citoxán, Neosar), dacarbazina (DTIC-Dome), ifosfamida (Ifex), lomustina (CCNU), mecloretamina (mostaza nitrogenada, Mustargén), melfalán (Alquerán) y Procarbazina (Matulana).

20 Otros agentes de quimioterapia estándares para el cáncer incluyen, entre otros, agentes alquilantes, tales como el carboplatino y el cisplatino; agentes alquilantes de mostaza nitrogenada; agentes alquilantes de nitrosourea, tales como la carmustina (BCNU); antimetabolitos, tales como el metotrexato; ácido folínico; antimetabolitos análogos de purina, mercaptopurina; antimetabolitos análogos de pirimidina, como el fluorouracilo (5-FU) y la gemcitabina (Gemzar®); antineoplásicos hormonales, como la goserelina, la leuprolida y el tamoxifeno; antineoplásicos naturales, como la aldesleucina, la interleucina-2, el docetaxel, el etopósido (VP-16), el interferón alfa, el paclitaxel (Taxol®) y la tretinoína (ATRA); antineoplásicos antibióticos naturales, tales como la bleomicina, la dactinomomicina, la daunorrubicina, la doxorubicina, la daunomicina y las mitomicinas, incluyendo la mitomicina C; y antineoplásicos naturales de alcaloide de la vinca, tales como la vinblastina, la vincristina, la vindesina; la hidroxiurea; la aceglatona, la adriamicina, la ifosfamida, la enocitabina, el epitiostanol, la aclarubicina, la ancitabina, la nimustina, el hidrocloreto de procarbazina,

25 la carboquona, el carboplatino, el carmofur, la cromomicina A3, los polisacáridos antitumorales, los factores antitumorales de plaquetas, la ciclofosfamida (Cytoxin®), el esquizofilano, la citarabina (arabinósido de citosina) la decarbazina, la tioinosina, la tiotepa, el tegafur, las dolastatinas, los análogos de dolastatina, como la auristatina, el CPT-11 (irinotecán), la mitozantrona, la vinorelbina, el tenipósido, la aminopterina, la carminomicina, las esperamicinas (véase, *por ejemplo*, la Patente de los EE.UU. No. 4.675.187), la neocarzinostatina, OK-432, la bleomicina, el furtulón,

30 la broxuridina, el busulfano, el honvan, la peplomomicina, la bestatina (Ubenimex®), el interferón-β, el mepitiostano, el mitobronitol, melfalán, los péptidos de laminina, el lentinán, el extracto de *Coriolus versicolor*, el tegafur/uracilo, la estramustina (estrógeno/mecloretamina).

Los agentes adicionales que pueden usarse como terapia para pacientes con cáncer incluyen EPO, G-CSF, ganciclovir;

40 antibióticos, leuprolida; meperidina; zidovudina (AZT); interleucinas 1 a 18, que incluyen mutantes y análogos; interferones o citocinas, como las hormonas interferones α, β y γ, como la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) y análogos, y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH); factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento transformante β (TGF-β), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de liberación de hormona de crecimiento (GHRF), el factor de crecimiento

45 epidérmico (EGF), el factor homólogo del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFHF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento de insulina (IGF); el factor de necrosis tumoral-α y β (TNF-α y β); el factor inhibidor de invasión-2 (IIF-2); proteínas morfogenéticas óseas 1-7 (BMP 1-7); somatostatina; timosina-α-1; γ-globulina; superóxido dismutasa (SOD); factores complementarios; y factores antiangiogénesis.

50 Los agentes terapéuticos útiles incluyen, profármacos, *por ejemplo*, precursores o formas derivadas de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica o no es citotóxica para las células tumorales, en comparación con el fármaco original, y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en una forma principal activa o más activa. Véase, *por ejemplo*, Wilman, *Biochemical Society Transactions*, 14:375-382 (1986) y Stella y col., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt y col., (ed.), pp. 247-267, Humana

55 Press (1985). Los profármacos incluyen, entre otros, profármacos que contienen fosfatos, profármacos que contienen tiofosfatos, profármacos que contienen sulfatos, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados por aminoácido D, profármacos glicosilados, profármacos que contienen b-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo.

60 Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivar en una forma de profármaco para utilizar en esta invención

incluyen, entre otros, los agentes de quimioterapia descritos anteriormente.

Cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia puede usarse para determinar si se induce una respuesta particular. Los procedimientos clínicos que evalúan el grado de un estado de enfermedad particular se pueden usar para determinar si se induce una respuesta. Los procedimientos particulares usados para evaluar una respuesta dependerán de la naturaleza del trastorno del paciente, la edad y el sexo del paciente, la administración de otros fármacos y el criterio del médico tratante.

EJEMPLOS

10

Ejemplo 1: El secuestro de sEcad induce apoptosis en células epiteliales mamarias malignas *in vitro*, pero no en las células epiteliales de mama humanas normales.

El desprendimiento del ectodominio de la cadherina-E fue descrita por primera vez por Wheelock y col. (J. Cell Biochem. 34:187-202 (1987)), quienes detectaron un fragmento soluble de 80 kDa en los medios de células de cáncer de mama MCF-7. Desde entonces, la escisión de este fragmento de sEcad se ha descrito en varios tipos celulares malignos y diferentes *in vitro*, incluyendo las células malignas de mama, piel, ovario, próstata, esófago, colon, pulmón y cerebro (Davies y col., Clin. Cancer Res. 7(10):3289-3297 (2001); Gil y col., Gynecol. Oncol. 108(2):361-369 (2008); Ito y col., Oncogene 18(50):7080-7090 (1999); Kantak y Kramer, 1998; Noe y col., J. Cell Sci. 114:111-118 (2001); Ryniers y col., Biol. Chem. 383:159-165 (2002); Symowicz y col., Cancer Res. 67(5):2030-2039 (2007)).

Para determinar si existen diferencias en la localización y el desprendimiento constitutivo de la cadherina-E entre las células benignas y malignas, se tiñeron células epiteliales de mama MCF-10A normales y células de cáncer de mama MCF-7 para la visualización de la cadherina-E por microscopía inmunofluorescente. Ambos tipos celulares se cultivaron en un portaobjetos de cámara de 4 pocillos (Nunc) en DMEM suplementado con FBS al 10 % hasta la confluencia. Las células se fijaron en metanol al 100 %, se inmunotifieron para la cadherina-E y se examinaron mediante microscopía de inmunofluorescencia (aumento x 20). Para marcar los núcleos, se usó la histona H1 (roja) (Santa Cruz). También analizamos los sobrenadantes para el ectodominio de la cadherina-E mediante ELISA. Los medios acondicionados de las células MCF-10A y MCF-7 confluentes se recogieron y analizaron para determinar los niveles de sEcad mediante ELISA (R&D Systems), según las instrucciones del fabricante.

Después de la exposición a un anticuerpo monoclonal específico para el subdominio EC1 de cadherina-E humana (SHE78-7, Zymed), observamos la inmunotinción de la cadherina-E en sitios de contacto célula a célula, más notablemente a lo largo de los bordes intercelulares dentro de grupos de células en ambas líneas celulares. Por el contrario, si bien el ectodominio de la cadherina-E soluble desprendido se detectó en los medios acondicionados de las células MCF-10A normales y las células cancerosas MCF-7, aumentó notablemente en la línea celular de cáncer MCF-7. Los niveles de sEcad fueron significativamente diferentes para las células MCF-10A frente a las células MCF-7.

A continuación, se cultivaron células MCF-10A y MCF-7 confluentes en presencia o ausencia de un anticuerpo dirigido contra el ectodominio de cadherina-E (DECMA; 20 µg/ml) o suero preinmune (IgG; 20 µg/ml) durante 48 horas y se analizó la apoptosis usando el kit de marcado de final de corte de biotina-dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL; Promega) según las instrucciones del fabricante. No hubo diferencia apreciable en la apoptosis entre las células MCF-10A normales que fueron expuestas al anticuerpo anti-sEcad y las células de control de isotipo o no tratadas. Por el contrario, las células cancerosas MCF-7 tratadas con anti-sEcad mostraron un marcado aumento en la apoptosis celular que no era evidente en las células no tratadas. Para confirmar aún más estos hallazgos, usamos un ensayo ELISA específico de apoptosis que mide fragmentos de ADN asociados a histonas citoplasmáticas (mononucleosomas y oligonucleosomas). Los lisados celulares de las células MCF-10A y MCF-7, cultivadas en presencia o ausencia de 20 µg/ml de anti-sEcad Ab o IgG durante 48 horas, se analizaron para detectar la apoptosis usando un ELISA específico de apoptosis para fragmentos de ADN asociados a histonas citoplasmáticas (ELISA^{PLUS} de detección de muerte celular, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Los resultados revelaron que el tratamiento anti-sEcad indujo dramáticamente la apoptosis en las células MCF-7, pero no tuvo un efecto apreciable en las células MCF-10A. Los niveles de necrosis no se vieron afectados por el tratamiento anti-sEcad en ninguna de las líneas celulares. Colectivamente, estos resultados muestran que inhibir o secuestrar el ectodominio de la cadherina-E desprendido del medio celular induce selectivamente la apoptosis en las células de cáncer de mama, mientras evita las células epiteliales de mama sanas normales.

Dado que la activación de p53 conduce a la regulación transcripcional de genes importantes para suprimir la tumorigénesis y su acción específica se ejerce principalmente a través de la activación de la apoptosis (Fuster y col., Trends Mol. Med. 13(5):192-199 (2007)), a continuación, quisimos determinar si p53 juega un papel en esta apoptosis

inducida por anti-sEcad. Mediante western blotting y con el uso de un anticuerpo dirigido contra p53, examinamos el efecto de anti-sEcad en la expresión de esta proteína proapoptótica en células MCF-7. Brevemente, 50 µg de lisados se sometieron a una electroforesis en geles con gradiente del 4 al 15 % (BioRad), se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y se inmunotransfirieron con anti-p53 (Santa Cruz; 1:400), lo cual fue seguido por el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1:3.000) y la detección mejorada por quimioluminiscencia (ECL). La carga igual de proteína se verificó mediante tinción con G3PDH. Tras 20 µg/ml de tratamiento con anti-sEcad, el valor de p53 comenzó a aumentar a partir de las 24 horas y alcanzó un nivel máximo a las 48 horas. Por el contrario, las células no tratadas o las células tratadas con el control de isotipo carecieron de expresión de p53. Dado que la presencia de p53 en un tumor se correlaciona con una respuesta favorable a la quimioterapia, y los bajos niveles de p53 confieren resistencia a los fármacos en las células cancerosas, creemos que la inhibición de sEcad en el medio tumoral puede mejorar la citotoxicidad y disminuir la resistencia que se desarrolla con las estrategias de quimioterapia actuales.

Ejemplo 2: Las células de carcinomas de células escamosas de la piel humana se someten a una apoptosis después del tratamiento con anticuerpos anti-sEcad, mientras que los queratinocitos humanos adultos normales se salvan.

Para determinar directamente si el desprendimiento constitutivo de sEcad difiere en cultivos de queratinocitos epiteliales normales versus carcinomas de células escamosas humanas (SCC), evaluamos los niveles de sEcad en queratinocitos de piel humana primaria normal (PHK) y en dos líneas celulares de SCC humanas (SCC12b y SCC13) diferentes. Las células PHK, SCC12b y SCC13 se cultivaron hasta ~ el 80 % de confluencia, y los niveles de sEcad en los sobrenadantes de cultivo fueron examinados mediante inmunotransferencia occidental. Brevemente, 60 µL de medios acondicionados de cada línea celular se sometieron a una electroforesis en geles con gradiente del 4 al 15 % (BioRad), se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y se inmunotransfirieron con anti-cadherina-E (Santa Cruz; 1:600), lo cual fue seguido por el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1:3.000) y la detección mejorada por quimioluminiscencia (ECL). Los medios acondicionados de las células PHK, SCC12b y SCC13 también se recolectaron y analizaron para determinar los niveles de sEcad mediante ELISA, según las instrucciones del fabricante. Observamos una mayor expresión de sEcad en ambas líneas celulares de SCC por western blotting. Esto correspondió a un aumento de más de 3 veces en los niveles de sEcad en las líneas celulares SCC12b y SCC13, sobre las células PHK no cancerosas mediante ELISA.

Para determinar si los anticuerpos anti-sEcad podrían inducir apoptosis en células de cáncer epitelial distintas de las células de cáncer de mama MCF-7 descritas anteriormente, cultivamos células PHK (D033), SCC12b y SCC13 hasta la confluencia en presencia o ausencia de anti-sEcad (20 µg/mL; DECMA; Sigma) o suero preinmune (IgG; "control de isotipo") durante 48 horas y analizamos las células para detectar la apoptosis usando el ensayo TUNEL según las instrucciones del fabricante.

Las células SCC12b y SCC13 exhibieron un marcado aumento en la apoptosis cuando se expusieron al anti-sEcad, mientras que el tratamiento de PHK normal con este anticuerpo de bloqueo no mostró efectos proapoptóticos detectables. Usando el ensayo ELISA específico de apoptosis, validamos aún más que el tratamiento de PHK con esta dosis de anti-sEcad no tuvo efectos sobre la apoptosis. En conjunto, estos datos muestran que el tratamiento anti-sEcad induce selectivamente la apoptosis en dos líneas celulares diferentes de cáncer de piel humano, pero no en cultivos de piel de queratinocitos humanos primarios normales.

Ejemplo 3: Los SCC de ratón son susceptibles a la apoptosis inducida por anti-sEcad.

Para investigar efectivamente un procedimiento de enfermedad como el cáncer de células escamosas, es prudente usar enfoques de modelos humanos y animales. Por lo tanto, queríamos determinar si el tratamiento anti-sEcad induciría selectivamente la apoptosis en una línea celular de SCC de ratón. De ser así, esto permitiría realizar más pruebas de la eficacia y la toxicidad de los agentes anti-sEcad *in vivo* usando un sistema modelo murino.

Primero determinamos, mediante ELISA, los niveles de sEcad en los medios acondicionados de queratinocitos primarios de ratón confluentes (PMK) y una línea celular de SCC de ratón (PAM212). Como se esperaba, el nivel de sEcad en la línea celular PAM212 fue casi dos veces mayor que los cultivos de control PMK. Estos niveles fueron confirmados mediante western blotting; los niveles relativos de sEcad fueron de dos a tres veces más altos en la línea celular PAM212. Por consiguiente, está claro que, al igual que con las células de cáncer humano de piel y de mama, el desprendimiento constitutivo del ectodominio de la cadherina-E es estadísticamente mayor en los SCC de ratón que en las células epiteliales sanas no cancerosas.

Para validar que el tratamiento anti-sEcad es selectivamente citotóxico para las SCC de ratón, se cultivaron células

PMK y PAM212 hasta la confluencia en presencia o ausencia de un anticuerpo dirigido contra el ectodominio de la cadherina-E (20 µg/mL DECMA; Sigma) o suero preinmune (IgG) durante 48 horas, y se analizó la apoptosis usando el ensayo TUNEL. Observamos un marcado aumento en las células positivas de TUNEL en la línea celular de las SCC, después de la incubación con el anticuerpo de bloqueo, pero no hubo una diferencia apreciable en los cultivos de PMK.

Estos resultados se confirmaron mediante un ensayo ELISA específico de apoptosis (ELISA^{PLUS} de detección de muerte celular (Boehringer Mannheim)) que mostró un aumento de más de 2 veces en la apoptosis en la línea celular PAM212 tratada con anti-sEcad y ninguna muerte celular apreciable en cultivos de PMK. Por el contrario, los niveles de necrosis no cambiaron en todas las condiciones probadas, independientemente del tipo celular.

Como previamente demostramos un aumento en los niveles de p53 en las células MCF-7 expuestas a 20 µg/ml de anticuerpo anti-sEcad, a continuación, determinamos si un aumento similar en p53 estaría presente en las células PAM212 cultivadas en presencia o ausencia de este anticuerpo de bloqueo o suero preinmune (IgG) durante 24 y 48 horas. Brevemente, 50 µg de lisados se sometieron a una electroforesis en geles con gradiente del 4 al 15 % (BioRad), se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y se inmunotransfirieron con anti-p53 (Santa Cruz; 1:400), lo cual fue seguido por el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1:3.000) y la detección mejorada por quimioluminiscencia (ECL). La carga igual de proteína se verificó mediante tinción con G3PDH. El análisis mediante western blotting demuestra un aumento notable en los niveles de p53, a las 24 y las 48 horas después del tratamiento anti-sEcad, pero no hay bandas en los controles IgG no tratados o de isotipo. Este tiempo de la expresión de p53 inducida por anti-sEcad es la misma que la hallada en la línea celular MCF-7, descrita anteriormente. Por lo tanto, es probable que esta muerte de células cancerosas inducidas por anti-sEcad ocurra a través de una vía dependiente de p53, aunque todavía no se han dilucidado los jugadores exactos aguas abajo.

Ejemplo 4: El bloqueo de sEcad no induce la apoptosis en otras células no cancerosas.

Se cultivaron fibroblastos de ratón 3T3 y células endoteliales humanas (HUVEC) en presencia o ausencia de anti-sEcad Ab o suero preinmune (IgG) durante 24 a 48 horas y se analizaron para detectar la apoptosis mediante TUNEL y el ensayo ELISA específico de apoptosis descrito anteriormente. En presencia del anticuerpo de bloqueo, las células 3T3 exhibieron pocos o ningún núcleo apoptótico usando el ensayo TUNEL y ningún cambio en la apoptosis por el ensayo ELISA específico de apoptosis. De manera similar, las células HUVEC tratadas con anti-sEcad no mostraron diferencias apreciables en la apoptosis mediante el uso de ambas estrategias. Además, las células 3T3 y HUVEC no mostraron cambios en la necrosis después de cultivar estas células en el anticuerpo de bloqueo de cadherina-E.

Ejemplo 5: La terapia con mAb anti-sEcad retrasa la aparición del tumor, impide la carga tumoral y disminuye el grado del tumor *in vivo*.

En este estudio, se usaron ratones transgénicos vírgenes femeninos MMTV-PyMT, caracterizados por un rápido desarrollo de tumores de cáncer de mama palpables que progresan a adenocarcinomas agresivos con metástasis a los pulmones (Guy y col. 1992; Bugge y col. 1998). A partir de los 48 días de edad, los ratones fueron tratados dos veces por semana con un anticuerpo monoclonal dirigido al dominio EC-5 de sEcad (α-sEcad; DECMA-1, Sigma Aldrich, 20 µg/200 µl de solución salina por ratón) o solución salina normal mediante inyecciones i.p. Los ratones fueron sacrificados a los 90 días de edad. Todos los ratones MMTV-PyMT tratados con solución salina desarrollaron tumores palpables a los 56 a 60 días, mientras que se observó un retraso estadísticamente significativo en la aparición de tumores en los ratones tratados (a los 81 a 85 días; véase la fig. 2A). Los ratones tratados con mAb EC5 de 90 días de edad exhibieron menos tumores totales, sobre los cuales se determinó histopatológicamente que estaban moderadamente diferenciados (Grado arquitectónico II y Grado nuclear I; véase la fig. 2B). Por el contrario, todos los tumores en ratones tratados con solución salina de 90 días estaban pobremente diferenciados (Grado arquitectónico III y grado nuclear III; véase la fig. 2C). Los ratones tratados con mAb también mostraron un peso tumoral total reducido y una carga de volumen.

En conclusión, nuestros resultados demuestran claramente que el tratamiento con anticuerpos anti-sEcad induce la muerte celular en una variedad de líneas celulares de cáncer epitelial (mama, piel y pulmón), al tiempo que evita células epiteliales sanas adyacentes normales, fibroblastos y células endoteliales. Proponemos que las células cancerosas secreten sEcad en el microentorno para imitar artificialmente los contactos normales célula a célula y para proporcionar un andamiaje funcional con las células vecinas adyacentes. Por consiguiente, al eliminar la sEcad del microentorno tumoral, perturbamos esta capacidad nutritiva del entorno de las células tumorales y activamos las vías moleculares dependientes de p53 involucradas en la muerte celular programada.

Se han descrito varias modalidades de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se dirige específicamente a uno o más del segundo, el tercero, el cuarto o el quinto subdominio (EC2, EC3, EC4 y EC5, respectivamente) de cadherina-E soluble (sEcad), pero no al primer subdominio (EC1) de sEcad para su uso en un procedimiento destinado al tratamiento del cáncer.
2. Un anticuerpo para usar en un procedimiento según la reivindicación 1, donde el anticuerpo se dirige específicamente a EC4 y/o EC5.
3. Un anticuerpo para usar en un procedimiento según la reivindicación 1, donde el anticuerpo se dirige específicamente a EC2 y/o EC3.
4. Un anticuerpo para usar en un procedimiento según la reivindicación 1, donde las células cancerosas son células tumorales derivadas del epitelio.
5. Un anticuerpo para usar en un procedimiento según la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, quimérico, monocatenario o humano.
6. Un anticuerpo para usar en un procedimiento según la reivindicación 1, donde el anticuerpo se administra en una formulación farmacéutica que:
 - (a) produce, tras la administración a un paciente, un nivel sérico del anticuerpo de 1 a 10 mg/kg, o
 - (b) produce, tras la adición a un cultivo celular, una concentración del anticuerpo de 1 a 500 µg/ml de medio de cultivo celular.
7. Un anticuerpo para usar en un procedimiento según la reivindicación 1, donde el anticuerpo se administra en una formulación farmacéutica por vía oral, intravenosa, nasal o mediante inhalación, administración intramuscular, intraperitoneal, transmucosa o transdérmica.
8. Un anticuerpo para usar en un procedimiento según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo se administra junto con un segundo tratamiento contra el cáncer.
9. Un anticuerpo para usar en un procedimiento según la reivindicación 1, donde el cáncer es un cáncer del tracto digestivo, del sistema nervioso central, de mama, de piel, del sistema reproductor, del pulmón o del tracto urinario.
10. Un anticuerpo para usar en un procedimiento según la reivindicación 1, donde el anticuerpo está marcado de manera detectable.
11. Un anticuerpo para usar en un procedimiento según la reivindicación 1, donde el cáncer es un carcinoma de células escamosas o un melanoma.
12. Un anticuerpo para usar en un procedimiento según la reivindicación 9, donde el cáncer del tracto digestivo es cáncer de boca, garganta, esófago, estómago, intestino, recto o ano.
13. Un anticuerpo para usar en un procedimiento según la reivindicación 9, donde el cáncer del sistema reproductor es cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer vulvar o labial, cáncer de próstata, cáncer testicular o cáncer del tracto genital masculino.
14. Una formulación farmacéutica para usar en un procedimiento para el tratamiento del cáncer que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la formulación farmacéutica está libre de una cantidad citotóxica de un excipiente.
15. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 14, donde la formulación farmacéutica se formula para la administración a un paciente por vía intravenosa.

FIG. 1A

```

MGPWSRSLSA LLLLLQVSSW LCQEPEPCHP GFDAESYTFT VPRRHLEGR 50
VLGRVNFEDC TGRQRTAYFS LDTRFKVGTG GVITVKRPLR FHN PQIHFLV 100
YAWDSTYRKF STKVTLNTVG HHRPPPHQA SVSGIQAELL TFPNSSPGLR 150
RQKRDWVIPP ISCPENEKGP FPKNLVQIKS NKDKEGKVFY SITGQGADTP 200
PVGVFIIERE TGWLKVTEPL DRERIATYTL FSHAVSSNGN AVEDPMEILI 250
TVTDQNDNKP EFTQEVFKGS VMEGALPGTS VMEVTATDAD DDVNTYNAAI 300
AYTILSODPE LPDKNMFTIN RNTGVISVVT TGLDRESFPT YTLVVOAADL 350
OGEGLSTTAT AVITVTDND NPPIFNPTTY KGOVPENEAN VVITTLKVTD 400
ADAPNTPAWE AVYTILNDDG GQFVVTTNPV NNDGILKTAK GLDFEAKQOY 450
ILHVAVTNVV PFEVSLTTST ATVTVDVLDV NEAPIFVPPE KRVEVSEDFG 500
VGQEITSYTA QEPDTFMEQK ITYRIWRDTA NWLEINPDTG AISTRAELDR 550
EDFEHVKNST YTALIIATDN GSPVATGTGT LLLILSDVND NAPIPEPRTI 600
FFCERNPKPQ VINIIDADLP PNTSPFTAEL THGASANWTI QYNDPTQESI 650
ILKPKMALEV GDYKINLKL M DNQNKDQVTT LEVSVCDCEG AAGVCRKAQP 700
VEAGLQIPAI LGILGGILAL LILILLLLLF LRRRAVVKEP LLPPEDDTRD 750
NVYYYDEEGG GEEDQDFDLS QLHRGLDARP EVTRNDVAPT LMSVPRYLPR 800
PANPDEIGNF IDENLKAADT DPTAPPYDSL LVFDYEGSGS EAASLSSLNS 850
SESDKDQDYD YLNEWGNRFK KLADMYGGGE DD 882

```

FIG. 1B

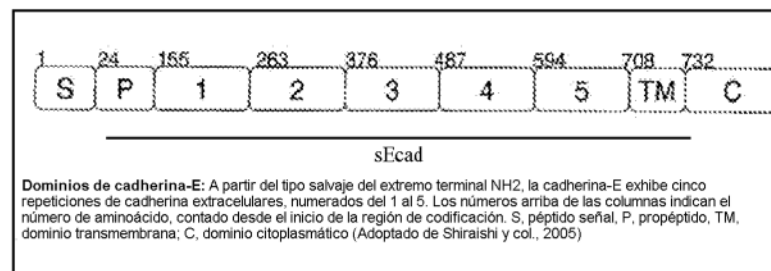


FIG. 2A, 2B, y 2C

