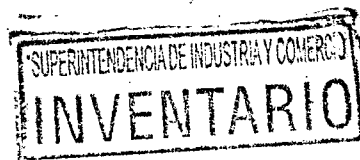




Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT



SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

10-27142

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO: "MEDIACION DE CITOTOXICIDAD DE CELULAS QUE EVIDENCIAN LA EXPRESION SUPERFICIAL DE CD9"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 16/30

71. SOLICITANTE : F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

DOMICILIO: BASILEA, SUIZA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLORED A RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C.

2010

(FORMA P 10).

Can.
17-03-2010
Un. Ejecutor

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-027142- -00000-0000

Fecha: 2010-03-08 16:13:14 Di. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

Dirección: Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basilea, Suiza

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza.

Lugar de Constitución: Suiza.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLORED A RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: YOUNG, David, S. F.; FINDLAY, Helen, P.; HANN, Susan, E.; CECHEITTO, Lisa, M. y FERRY, Alison L.

(Folio 27)

Dirección: 33 University Avenue, Suite 2407, Toronto, Ontario M5J 2S7; 205 Glendonwynne Road, Toronto, Ontario M6P 3E9; 9 Innisfree Court, Toronto, Ontario M6S 3BN7; Unit 510 DaeLim Arvill Apartment House Daesagwan 9 (gu)-gil 11, Yongsan-gu Seoul 140-212 y 143 Grenadier Crescent, Thornhill, Ontario L4J 7V6.

Nacionalidad o Domicilio: Canadá y República de Corea.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/CA2008/001452

Fecha: 13/08/08

Publicación Internacional No. WO 2009/023955 A1

Fecha: 26/02/09

⑥

Título (54) "MEDIACION DE CITOTOXICIDAD DE CELULAS QUE EVIDENCIAN LA EXPRESION SUPERFICIAL DE CD9"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/30 A61P 37/04, 601N 33/566

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

17/08/07

60/965,165

US

06/02/08

61/026,584

US

11/04/08

61/124,019

⑨

Comprobante de Pago No. 09-97,017 y 10-576

Fecha: 23-12-09 y 05-01-2010

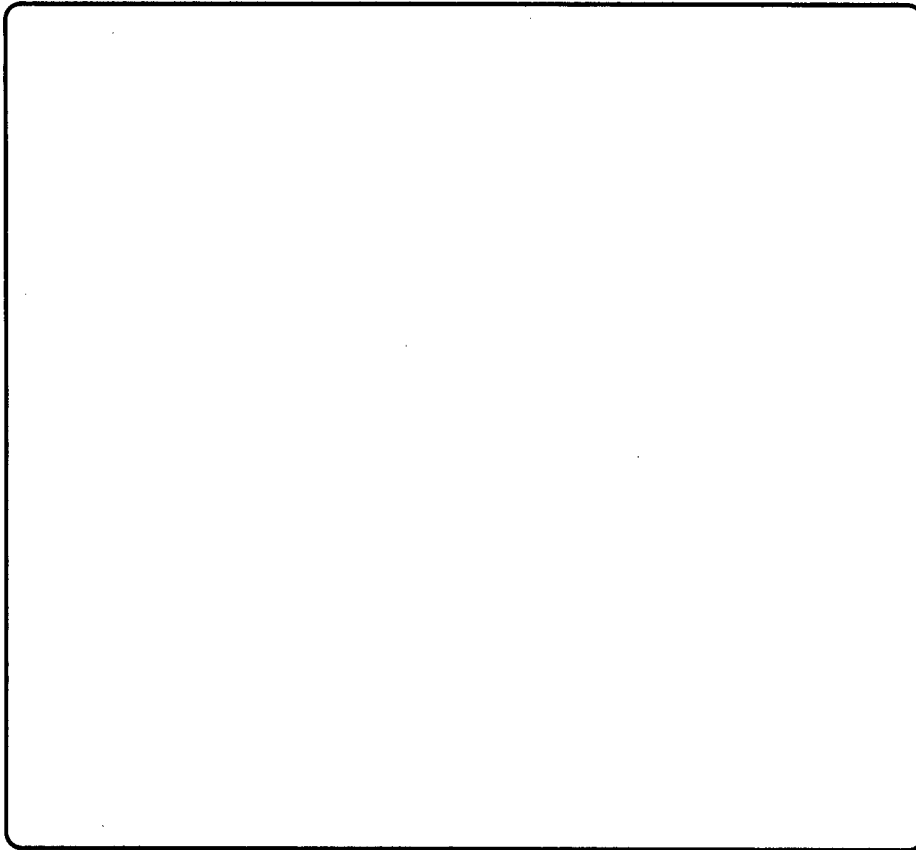
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Declaraciones (Declaración bajo las Reglas 4.17(ii) y 51bis.1(a)(ii) que acreditan el traspaso de los inventores al solicitante)
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional, Publicación, Notificación de cambio de solicitante, Notificación de cambio de dirección del inventor CECHECETO, Lisa, M., Opinión Escrita y documento de indicaciones relacionadas con microorganismos depositados u otro material biológico con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

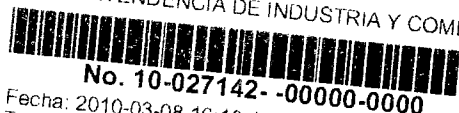
T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 97,017
FECHA : DICIEMBRE 23 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-027142- -00000-0000

Fecha: 2010-03-08 16:13:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	36907905	23/12/2009	19,160,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
			540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000170089-2

RECIBO OFICIAL DE CATA : 10 576
FECHA : ENERO 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-027142- -00000-0000

Fecha: 2010-03-08 16:13:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

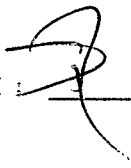
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORENDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	36907964	05/01/2010	5.238.400,00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005 01-01	SOLICITUDES	
		998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA AND ANTR	14.000,00
		TOTAL :	\$ 14.000,00

SON: CATORCE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CATA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDADA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDADA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

Cancillería de Estado

de la ciudad de Basel (Basilea)

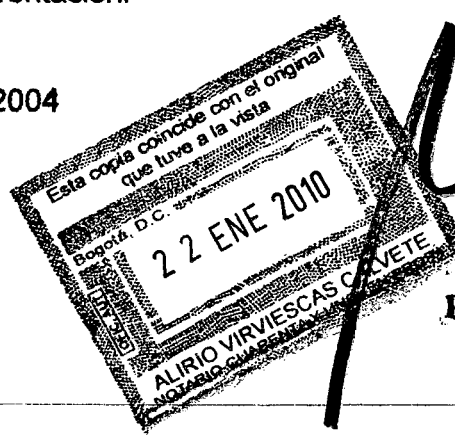
10. Firma

Fdo.: firma ilegible

Ruedi Eggs

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004



Maria Mercedes Uricoechea T.
Maria Mercedes Uricoechea T.
Traductora Juramentada
Resolución 10607/81 Minjusticia

TRANSLACION OFICIAL No.

de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se selló con el sello
de la redacción, lo mismo que la presente.

Transcripción de la apostilla en inglés que se encuentra en la transcripción de la
legalización de las firmas de los señores Krummel y Shabel, por lo tanto la presente
de la K. Holmann-La Roche, que aparece en un documento de fecha escrita en
español e inglés, contenido a ALICIA LLORENDA DE OLIVERA TAMAYO, y
IGNACIO SANTAMARIA y/o EMILIO ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el
notario Fritz Kuster, bajo el No. 20044, el 14 de mayo de 1994, en Basilea, Suiza.

TRANSLACION OFICIAL

(Conversión de la fecha de 5 octubre 1991)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. J. Krummel y Shabel, en calidad de notario.
3. Actuado en calidad de notario.
4. Lleva el sello del mencionado

5. en Basel (Basilea)

Y por la Cancillería de Estado del Cantón de Basilea, el No. 20044, el 14 de mayo de 1994.

6. Sello

(Cancillería de Estado)

en la ciudad de Basel (Basilea)

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET - 3 P 12:12

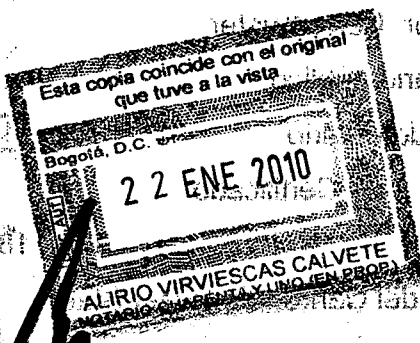
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

258651

Planeta Unicochea

COYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS



ES TRANSLACION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de
esta oficina para su conservación.

Bogotá, 2 de septiembre de 2004

Los abajo firmados, **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza.

con domicilio en **4070 Basilea, Suiza**

The undersigned, **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at **4070 Basel, Switzerland**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a arbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

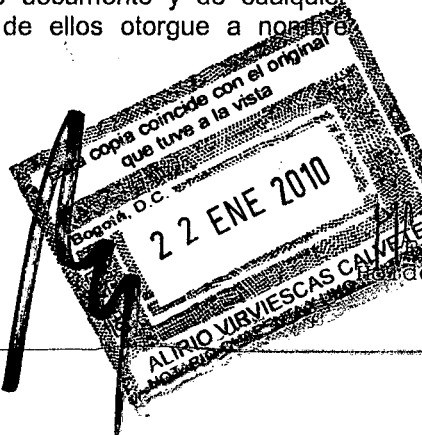
Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this *11th day of August 2008*.
F. Hoffmann-La Roche AG

[Signature]
Dolin Klausner
Power of procurator

[Signature]
Denise Strebel
Mandatory



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Suiza
Basilea

{ss

El día 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Strebel, ambos ciudadanos y residentes suizos, de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es titular del poder/mandatario de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Suiza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Suiza, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Suiza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Suiza, ciudad de Basilea, con fecha 19 Junio 1997, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Switzerland
Basel

{ss

On this 17th day of August, 2004, personally Fridolin Klausner and Denise Strebel came both Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Suiza, ciudad de Basel, under date of 19th day of June 1997, and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of two thousand and four)

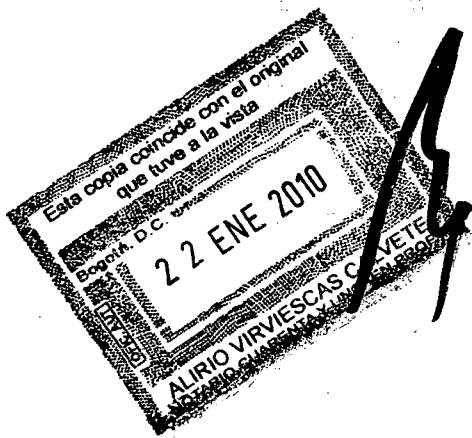
Dr. P. Kuster
Notar

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel



Allg. Prot.

No. 20



OFFICIAL AUTHENTICATION
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by

3. in his/her function as

4. and certified by the seal of the

Certified

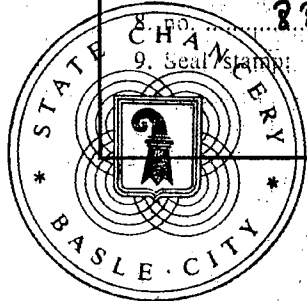
18. Aug. 2004

5. in Basel (Bâle)

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 16/30	
(22) Fecha de solicitud: 08-03-2010		(71) Solicitante(s) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/965,165	17-08-07	US
	61/026,584	06-02-08	US
	61/124,019	11-04-08	US
		(72) Inventor(es) YOUNG, David, S. F.; FINDLAY, Helen, P.; HANN, Susan, E.; CECHETTO, Lisa, M. y FERRY, Alison L.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 17-03-2010		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 26/02/09	
Fecha de presentación de la solicitud: 13/08/08		N° publicación: WO 2009/023955 A1	
No. de solicitud PCT/CA2008/001452			
(54) Titulo: "MEDIACION DE CITOTOXICIDAD DE CELULAS QUE EVIDENCIAN LA EXPRESION SUPERFICIAL DE CD9"			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

El anticuerpo monoclonal aislado caracterizado porque es producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION PCT X MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 08/03/2010

(51) Clasificación Internacional : C07K 16/30

(71) Solicitante(s) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

(72) Inventor(es) YOUNG, David, S. F.; FINDLAY, Helen, P.; HANN, Susan, E.; CECETTO, Lisa, M. y FERRY, Alison L.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/965,165	17-08-07	US
	61/026,584	06-02-08	US
	61/124,019	11-04-08	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 17-03-2010

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 26/02/09

Fecha de presentación de la solicitud: 13/08/08

N° publicación: WO 2009/023955 A1

No. de solicitud PCT/CA2008/001452

(54) Título: "MEDIACION DE CITOTOXICIDAD DE CELULAS QUE EVIDENCIAN LA EXPRESION SUPERFICIAL DE CD9"



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION

PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD

DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 08/03/2010

(51) Clasificación Internacional : C07K 16/30

(71) Solicitante(s) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

(72) Inventor(es) YOUNG, David, S. F.; FINDLAY, Helen, P.; HANN, Susan, E.; CECETTO, Lisa, M. y FERRY, Alison L.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/965,165	17/08/07	US
	61/026,584	06/02/08	US
	61/124,019	11/04/08	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 17-03-2010

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 13/08/08
No. De solicitud **PCT/CA2008/001452**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **26/02/09**

No. Publicación : **WO 2009023955 A1**

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Título: **"MEDIACION DE CITOTOXICIDAD DE CELULAS QUE EVIDENCIAN LA EXPRESION SUPERFICIAL DE CD9"**

(57) Resumen:

Reivindicación número 1:

El anticuerpo monoclonal aislado caracterizado porque es producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2008/001452

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: C07K 16/30, A61K 39/395, A61K 47/48, A61K 51/10, A61P 35/00, A61P 37/04, C07K 16/28, C07K 16/46, C12N 5/16, C12P 21/08, G01N 33/566, G01N 33/574, G01N 33/577, C07K 14/705, C07K 19/00 (all, 2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K 16/30, A61K 39/395, A61K 47/48, A61K 51/10, A61P 35/00, A61P 37/04, C07K 16/28, C07K 16/46, C12N 5/16, C12P 21/08, G01N 33/566, G01N 33/574, G01N 33/577, C07K 14/705, C07K 19/00 (all, 2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)

Canadian Patent Database, Delphion, Pubmed, GQPAT, Swiss-Prot, TrEMBL, RefSeq Protein, NCBI GenPept, IPI, ENSEMBL, PDB Prot.
Terms: CD9, cancer, tumour, antibody, CDMAB, 141204-01, AR40A746.2.3, prostate, breast, pancreatic, ovarian, colon, immunotherapy.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OVALLE, S. et al. The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells. Int. J. Cancer., published online 20 June 2007 in Wiley Interscience, Vol. 121, pages 2140-2152, whole document	1 to 63
Y	US 6180357 B1 YOUNG, D. S. F. & TAKAHASHI, M. 30 January 2001 whole document	1 to 63
Y	RIECHMANN, L. et al. Reshaping human antibodies for therapy. Nature, 24 March 1988, Vol. 332, pages 323-327, whole document	2, 3, 5, 7 to 9, 15, 16, 22, 23, 29, 30, 36, 37, 43, 44, 47 to 50, 55 and 57 to 62

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

10 October 2008 (10-10-2008)

Date of mailing of the international search report

22 October 2008 (22-10-2008)

Name and mailing address of the ISA/CA
Canadian Intellectual Property Office
Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT
50 Victoria Street
Gatineau, Quebec K1A 0C9
Facsimile No.: 001-819-953-2476

Authorized officer

Mimi Yurack 819- 994-5077

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :

1. ☒ Claim Nos. : 5 and 10 to 46
 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

 Although claims 5 and 10 to 46 encompass a method of treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search under Rule 39.1 (iv) of the PCT, the search has been carried out based on the alleged effects or purposes/uses of the antibody defined in claims 5 and 10 to 46.
2. ☐ Claim Nos. :
 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :
3. ☐ Claim Nos. :
 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos. :

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2008/001452

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HUANG, H. et al. Aberrant expression of novel and previously described cell membrane markers in human breast cancer cell lines and tumors. Clin. Cancer Res., 15 June 2005, Vol. 11, No. 12, pages 4357-4364, whole document	5, 10 to 46 and 60 to 62
Y	GRØNBORG, M. et al. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. Mol. Cell. Proteomics, January 2006, Vol. 5, No. 1, pages 157-171, whole document	5, 10 to 46 and 60 to 62
Y	WANG, J.-C. et al. Down-regulation of CD9 expression during prostate carcinoma progression is associated with CD9 mRNA modifications. Clin. Cancer Res., 15 April 2007, Vol. 13, No. 8, pages 2354-2361, whole document	5, 10 to 46 and 60 to 62
Y	PETERS, D. G. et al. Comparative gene expression analysis of ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium by serial analysis of gene expression. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., July 2005, Vol. 14, No. 7, pages 1717-1723, whole document	60
A	MAECKER, H. T. et al. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. FASEBJ., May 1997, Vol. 11, No. 6, pages 428-442, whole document	1 to 63
P,X	MENENDEZ, J. et al. Anti-CD9 antibody, AR40A746.2.3, inhibits tumor growth in pancreatic and breast cancer models and recognizes CD9 on CD34 ⁺ CD38 ⁺ leukemic cancer stem cells. In: Proceedings of the 99 th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 12 to 16 April 2008; San Diego, CA. Philadelphia (PA):AACR; 2008, Abstract No. 3993, whole document D1 and D2 can be combined with D4 or D5 or D6	1 to 63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2008/001452

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US6180357	30-01-2008	AT348112T T	15-01-2007
		AU2004205435 A1	05-08-2004
		AU2004228078 A1	21-10-2004
		AU2004248865 A1	29-12-2004
		AU2004266045 A1	03-03-2005
		AU2005225472 A1	06-10-2005
		AU2005226797 A1	06-10-2005
		AU2005226798 A1	06-10-2005
		AU2005226799 A1	06-10-2005
		AU2005284618 A1	23-03-2006
		AU2005287814 A1	30-03-2006
		AU2005324259 A1	13-07-2006
		CA2513772 A1	05-08-2004
		CA2521375 A1	21-10-2004
		CA2530214 A1	29-12-2004
		CA2536359 A1	03-03-2005
		CA2560859 A1	06-10-2005
		CA2560862 A1	06-10-2005
		CA2560864 A1	06-10-2005
		CA2561192 A1	06-10-2005
		CA2579900 A1	23-03-2006
		CA2579905 A1	30-03-2006
		CA2594143 A1	13-07-2006
		CN1761683 A	19-04-2006
		CN1802387 A	12-07-2006
		CN1849136 A	18-10-2006
		CN1901936 A	24-01-2007
		CN1960754 A	09-05-2007
		CN1960755 A	09-05-2007
		CN1960756 A	09-05-2007
		CN101023164 A	22-08-2007
		CN101084013 A	05-12-2007
		CN101107267 A	16-01-2008
		CN101189266 A	28-05-2008
		CN101214376 A	09-07-2008
		DE602004003689D D1	25-01-2007
		DK1613656T T3	12-03-2007
		EP1587836 A2	26-10-2005
		EP1613656 A1	11-01-2006
		EP1635869 A1	22-03-2006
		EP1667716 A1	14-06-2006
		EP1732601 A1	20-12-2006
		EP1732602 A1	20-12-2006
		EP1732603 A1	20-12-2006
		EP1735432 A1	27-12-2006
		EP1757620 A2	28-02-2007
		EP1796721 A1	20-06-2007
		EP1799712 A1	27-06-2007
		EP1841795 A1	10-10-2007
		ES2278309T T3	01-08-2007
		JP2007503377T T	22-02-2007
		JP2007523834T T	23-08-2007
		JP2007523838T T	23-08-2007
		JP2007523851T T	23-08-2007
		JP2007530456T T	01-11-2007
		JP2007530457T T	01-11-2007
		JP2007530458T T	01-11-2007
		JP2007530460T T	01-11-2007
		JP2008513361T T	01-05-2008
		JP2008514550T T	08-05-2008
		NZ541366 A	30-06-2008
		NZ542927 A	30-04-2008
		SI1613656T T1	30-04-2007
		US6657048 B2	02-12-2003
		US6794494 B1	21-09-2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2008/001452

US7009040 B2	07-03-2006
US7009040 B2	07-03-2006
US7175846 B2	13-02-2007
US7186808 B2	06-03-2007
US7189397 B2	13-03-2007
US7189825 B2	13-03-2007
US7195764 B2	27-03-2007
US7247476 B2	24-07-2007
US7252821 B2	07-08-2007
US7256271 B2	14-08-2007
US7256272 B2	14-08-2007
US7361342 B2	22-04-2008
US7361343 B2	22-04-2008
US7393531 B2	01-07-2008
US7419792 B2	02-09-2008
US7420039 B2	02-09-2008
US2001003777 A1	14-06-2001
US2001009665 A1	26-07-2001
US2003031672 A1	13-02-2003
US2003054006 A1	20-03-2003
US2004001789 A1	01-01-2004
US2004105816 A1	03-06-2004
US2004141979 A1	22-07-2004
US2004180002 A1	16-09-2004
US2005063967 A1	24-03-2005
US2005100542 A1	12-05-2005
US2006073144 A1	06-04-2006
US2006140963 A1	29-06-2006
US2006204497 A1	14-09-2006
US2006210474 A1	21-09-2006
US2006216233 A1	28-09-2006
US2006216234 A1	28-09-2006
US2006216235 A1	28-09-2006
US2006269481 A1	30-11-2006
US2007025912 A1	01-02-2007
US2007053836 A1	08-03-2007
US2007189964 A1	16-08-2007
US2007248538 A1	25-10-2007
US2008015338 A1	17-01-2008
US2008019965 A1	24-01-2008
US2008025977 A1	31-01-2008
US2008044408 A1	21-02-2008
US2008124327 A1	29-05-2008
US2008131429 A1	05-06-2008
US2008213169 A1	04-09-2008
US2008213171 A1	04-09-2008
US2008219919 A1	11-09-2008
WO2004065421 A1	05-08-2004
WO2004065422 A2	05-08-2004
WO2004087205 A1	14-10-2004
WO2004089989 A1	21-10-2004
WO2004112834 A1	29-12-2004
WO2005018667 A1	03-03-2005
WO2005092375 A1	06-10-2005
WO2005092376 A1	06-10-2005
WO2005092377 A1	06-10-2005
WO2005093048 A1	06-10-2005
WO2006029497 A1	23-03-2006
WO2006032127 A1	30-03-2006
WO2006072166 A1	13-07-2006
WO2007095729 A1	30-08-2007
WO2007095747 A1	30-08-2007
WO2007098575 A1	07-09-2007
WO2007101331 A1	13-09-2007
WO2007101332 A1	13-09-2007
WO2008011710 A1	31-01-2008
WO2008014583 A1	07-02-2008

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
26 February 2009 (26.02.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/023955 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 16/30 (2006.01) **C12N 5/16** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **C12P 21/08** (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) **G01N 33/566** (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01) **G01N 33/574** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **G01N 33/577** (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) **C07K 14/705** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) **C07K 19/00** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/CA2008/001452

(22) International Filing Date: 13 August 2008 (13.08.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/965,165 17 August 2007 (17.08.2007) US
 61/026,584 6 February 2008 (06.02.2008) US
 61/124,019 11 April 2008 (11.04.2008) US

(71) Applicant: **ARIUS RESEARCH INC.** [CA/CA]; 55 York Street, 15th Floor, Toronto, Ontario M5J 1R7 (CA).(72) Inventors: **YOUNG, David S. F.**; 33 University Avenue, Suite 2407, Toronto, Ontario M5J 2S7 (CA). **FINDLAY,**

Helen P.; 205 Glendonwynne Road, Toronto, Ontario M6P 3E9 (CA). **HANN, Susan E.**; 9 Innisfree Court, Toronto, Ontario M6S 3B7 (CA). **CECHETTO, Lisa M.**; Unit 303 of JSD Ville II, 653-31 Hannam-dong, Yongsan-gu, Seoul 140-210 (KR). **FERRY, Alison L.**; 143 Grenadier Crescent, Thornhill, Ontario L4J 7V6 (CA).

(74) Agent: **SINGLEHURST, John C.**; Finlayson & Singlehurst, 70 Gloucester Street, Ottawa, Ontario K2P 0A2 (CA).

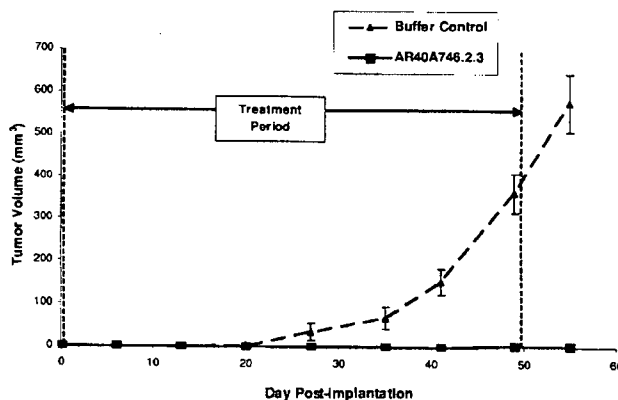
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

[Continued on next page]

(54) Title: CYTOTOXICITY MEDIATION OF CELLS EVIDENCING SURFACE EXPRESSION OF CD9

FIGURE 4



(57) Abstract: This invention relates to the staging, diagnosis and treatment of cancerous diseases (both primary tumours and tumour metastases), particularly to the mediation of cytotoxicity of tumour cells evidencing surface expression of CD9, and most particularly to the use of cancerous disease modifying antibodies (CDMAB), optionally in combination with one or more CDMAB/chemotherapeutic agents, as a means for initiating the cytotoxic response. The invention further relates to binding assays, which utilize the CDMAB of the instant invention. The anti-cancer antibodies can be conjugated to toxins, enzymes, radioactive compounds, cytokines, interferons, target or reporter moieties and hematogenous cells.

WO 2009/023955 A1

WO 2009/023955 A1



FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report*

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SINGLEHURST, John C.
Finlayson & Singlehurst
70 Gloucester Street
Ottawa, Ontario K2P 0A2
CANADA

Date of mailing (day/month/year) 11 August 2009 (11.08.2009)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 20561.120	
International application No. PCT/CA2008/001452	International filing date (day/month/year) 13 August 2008 (13.08.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address ARIUS RESEARCH INC. 55 York Street 15th Floor Toronto, Ontario M5J 1R7 Canada	State of Nationality CA	State of Residence CA
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address F. HOFFMANN-LA ROCHE AG Grenzacherstrasse 124 CH-4070 Basel Switzerland	State of Nationality CH	State of Residence CH
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

The request for recording of the above change was received by the International Bureau between 20 and 30 months from the priority date.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 89 95	Authorized officer Vernhes Thierry e-mail pt04.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 04
---	--

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

Gowling Lafleur Henderson LLP.
160 Elgin Street, Suite 2600
Ottawa, Ontario
Canada K1P 1C3
CANADA

Date of mailing (day/month/year)

17 December 2009 (17.12.2009)

Applicant's or agent's file reference

08914558WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/CA2008/001452

International filing date (day/month/year)

13 August 2008 (13.08.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant☒ the inventor☐ the agent☐ the common representative

Name and Address

CECHETTO, Lisa M.
Unit 303 of JSD Ville II
653-31 Hannam-dong, Yongsan-gu
Seoul 140-210
Republic of Korea

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person☐ the name☒ the address☐ the nationality☐ the residence

Name and Address

CECHETTO, Lisa M.
Unit 510, DaeLim Arvill Aptment House
Daesagwan 9 (gu)-gil 11, Yongsan-gu
Seoul, 140-212
Republic of Korea

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

The request for recording of the above change was received by the International Bureau between 20 and 30 months from the priority date.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office.☐ the International Searching Authority☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority☒ the designated Offices concerned☐ the elected Offices concerned☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Laniel David

e-mail pt04.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 04

Facsimile No. +41 22 338 89 95

WO 2009/023955

PCT/CA2008/001452

Autoridad Depositaria Internacional de Canadá

Tel: (204) 789-2070

Laboratorio Nacional de Microbiología, Salud de Canadá

Fax: (204) 789-2097

1015 Arlington Street

Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

Forma Internacional IDAC/BP/4

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPOSITO ORIGINAL

(expedido según la Regla 7.1 de las Regulaciones del Tratado de Budapest)

ADJUNTE COPIAS DEL CONTRATO DE DEPOSITO ORIGINAL Y DECLARACION DE VIABILIDAD

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el depósito del microorganismo especificado a continuación, que fue recibido por ella el 14 de diciembre de 2004

Para (Nombre del Depositante): Valerie Harris

Dirección: ARIUS Research Inc., 55 York Street, Suite 1600, Toronto, ON M5J 1R7

Identificación del Depósito

Referencia asignada por el depositante: AR40A746.2.3

Número de Adhesión asignado por esta IDA: 141204-01

El depósito identificado anteriormente estaba acompañado por:

- ☐ una descripción científica (especificar): _____
- ☐ una designación taxonómica propuesta (especificar): _____

Firma de la persona(s) autorizada para representar a IDAC:
(ilegible)

Fecha: 17 de diciembre de 2004

Recibo en el Caso de un Deposito Original 1/1

Archivo 067 (04)

WO 2009/023955

PCT/CA2008/001452

Autoridad Depositaria Internacional de Canadá

Tel: (204) 789-2070

Laboratorio Nacional de Microbiología, Salud de Canadá

Fax: (204) 789-2097

1015 Arlington Street

Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

Forma Internacional IDAC/BP/9

DECLARACION DE VIABILIDAD

(expedido según la Regla 10.2 de las Regulaciones del *Tratado de Budapest*)

Parte a Quien se le Expide la Declaración de Viabilidad

Nombre: Ferris Lander

Dirección: 2855 PGA Boulevard, Palm Beach Gardens, Florida, USA 33410

Depositante

Nombre: Valerie Harris

Dirección: ARIUS Research Inc., 55 York Street, Suite 1600, Toronto, ON M5J 1R7

Identificación del Depósito

Número de Adhesión dado por la Autoridad Depositaria Internacional: 141204-01

Fecha del depósito original (o fecha relevante más reciente): 14 de diciembre de 2004

Examen de Viabilidad

La viabilidad del depósito identificado anteriormente fue examinada en (fecha más reciente del examen): 14 de diciembre de 2004

En la fecha identificada anteriormente, el cultivo era:

☒ viable

☐ ya no era viable

Las condiciones bajo la cual se llevó a cabo el Examen de Viabilidad (para ser llenado si la información ha sido solicitada y los resultados del examen fueron negativos):

Firma de la persona(s) autorizada para representar a IDAC:

(ilegible)

Fecha: 17 de diciembre de 2004

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

WO 2009/023955

PCT/CA2008/001452

International Depositary Authority of Canada
National Microbiology Laboratory, Health Canada
1015 Arlington Street
Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

Tel: (204) 789-2070
Fax: (204) 789-2097

International Form IDAC/BP/4

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
(issued pursuant to Rule 7.1 of the *Budapest Treaty* Regulations)

ATTACH COPIES OF THE ORIGINAL DEPOSIT CONTRACT AND VIABILITY STATEMENT

This International Depositary Authority accepts the deposit of the microorganism specified below, which was received by it on December 14, 2004

To (Name of Depositor): Valerie Harris

Address: ARIUS Research Inc. 55 York Street, Suite 1600, Toronto, ON M5J 1R7

Identification of Deposit

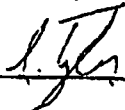
Reference assigned by depositor: AR40A746.2.3

Accession Number assigned by this IDA: 141204-01

The deposit identified above was accompanied by:

- ☐ a scientific description (specify): _____
- ☐ a proposed taxonomic designation (specify): _____

Signature of person(s) authorized to represent IDAC:



Date: December 17, 2004

Receipt in the Case of an Original Deposit 1/1

File 067 (04)

IWO 2009/023955 **Depository Authority of Canada**
National Microbiology Laboratory, Health Canada
1015 Arlington Street
Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

PCT/CA2008/001452⁷⁰
Fax: (204) 789-2097

International Form IDAC/BP/9

STATEMENT OF VIABILITY

(Issued pursuant to Rule 10.2 of the *Budapest Treaty Regulations*)

Party to Whom the Viability Statement is Issued

Name: Ferris Lander

Address: 2855 PGA Boulevard, Palm Beach Gardens, Florida, USA 33410

Depositor

Name: Valerie Harris

Address: ARIUS Research Inc., 55 York Street, Suite 1600, Toronto, ON M5J 1R7

Identification of the Deposit

Accession Number given by the International Depository Authority: 141204-01

Date of the original deposit (or most recent relevant date): December 14, 2004

Viability Test

Viability of the deposit identified above was tested on (most recent date): Dec. 14, 2004

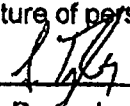
On the date indicated above, the culture was:

☒ viable

☐ no longer viable

Conditions under which the Viability Test were performed (to be filled in if the information has been requested and the results of the test were negative): _____

Signature of person(s) authorized to represent IDAC


Date: December 17, 2004

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
SINGLEHURST, JOHN C.
c/o Finlayson & Singlehurst
70 Gloucester Street
4th Floor
OTTAWA, Ontario
Canada, K2P 0A2

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing 22 October 2008 (22-10-2008)
(day/month/year)

Applicant's or agent's file reference
20561.120

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/CA2008/001452

International filing date (day/month/year)
13 August 2008 (13-08-2008)

Priority date (day/month/year)
17 August 2007 (17-08-2007)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC: C07K 16/30, A61K 39/395, A61K 47/48, A61K 51/10, A61P 35/00, A61P 37/04, C07K 16/28, C07K 16/46, C12N 5/16, C12P 21/08, G01N 33/566, G01N 33/574, G01N 33/577, C07K 14/703, C07K 19/00 (all, 2006.01)

Applicant
ARIUS RESEARCH INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items :

- | | |
|--|--|
| ☒ Box No. I | Basis of the opinion |
| ☐ Box No. II | Priority |
| ☒ Box No. III | Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| ☐ Box No. IV | Lack of unity of invention |
| ☒ Box No. V | Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| ☐ Box No. VI | Certain documents cited |
| ☒ Box No. VII | Certain defects in the international application |
| ☒ Box No. VIII | Certain observations on the international application |

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1b(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/CA
Canadian Intellectual Property Office
Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT
50 Victoria Street
Gatineau, Quebec K1A 0C9
Facsimile No.: 001-819-953-2476

Date of completion of this opinion
17 October 2008 (17-10-2008)

Authorized officer
Mimi Yurack 819-994-5077

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/CA2008/001452

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed

☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material

☒ a sequence listing

☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☒ on paper

☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing

☐ contained in the international application as filed.

☐ filed together with the international application in electronic form

☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/CA2008/001452

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application
☒ claim Nos. 5 and 10 to 46

because:

- ☒ the said international application, or the said claim Nos. 5 and 10 to 46 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

Claims 5 and 10 to 46 which encompass a method of treatment of the human or animal body by surgery or therapy, are not required to be searched nor is a written opinion required by this Authority under Rule 67.1(iv) of the PCT. Regardless, this Authority has established a written opinion based on the alleged effects or purposes/uses of the antibody defined in claims 5 and 10 to 46.

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claim Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos.

- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).

- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

- ☐ See Supplemental Box for further details.

Box No. V	Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement		
1. Statement			
Novelty (N)	Claims <u>1 to 63</u>	YES	
	Claims <u>none</u>	NO	
Inventive step (IS)	Claims <u>none</u>	YES	
	Claims <u>1 to 63</u>	NO	
Industrial applicability (IA)	Claims <u>1 to 63</u>	YES	
	Claims <u>none</u>	NO	
2. Citations and explanations :			
D1: OVALLE, S. ET AL. The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells. Int. J. Cancer, published online 20 June 2007 in Wiley Interscience, Vol. 121, pages 2140-2152.			
D2: US 6180357 B1, YOUNG, D. S. P. & TAKAHASHI, M., 30 January 2001.			
D3: RIECHMANN, L. ET AL. Reshaping human antibodies for therapy. Nature, 24 March 1988, Vol. 332, pages 323-327.			
D4: HUANG, H. ET AL. Aberrant expression of novel and previously described cell membrane markers in human breast cancer cell lines and tumors. Clin. Cancer Res., 15 June 2005, Vol. 11, No. 12, pages 4357-4364.			
D5: GRØNBORG, M. ET AL. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. Mol. Cell. Proteomics, January 2006, Vol. 5, No. 1, pages 157-171.			
D6: WANG, J.-C. ET AL. Down-regulation of CD9 expression during prostate carcinoma progression is associated with CD9 mRNA modifications. Clin. Cancer Res., 15 April 2007, Vol. 13, No. 8, pages 2354-2361.			
D7: PETERS, D. G. ET AL. Comparative gene expression analysis of ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium by serial analysis of gene expression. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., July 2005, Vol. 14, No. 7, pages 1717-1723.			
D1 discloses the effect of anti-CD9 monoclonal antibodies (mAbs) on the tumorigenic process in human colon carcinoma cell lines <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> . Several anti-CD9 mAbs enhanced integrin-mediated cell adhesion, induced <i>in vitro</i> characteristic morphological changes and inhibited cell proliferation and <i>in vivo</i> tumorigenic capacities.			
D2 discloses the generation of several anti-cancer cytotoxic mAbs upon immunization of mice with single cell suspensions of biopsy specimens of human breast, melanoma and lung tumours. Antibodies produced are screened using cytotoxicity against a variety of cancer cells. Antibodies that are cytotoxic to cancer cells but not to non-cancerous cells are used in binding assays and in methods of reducing tumour burden in mammals.			
D3 discloses methods for generating humanized and chimeric antibodies based on the amino acid sequences of the variable regions and the antigen binding regions of a non-human antibody.			
D4 discloses that CD9 expression was down-regulated in breast carcinoma tumours as determined by immunohistochemistry, confirming the important role of CD9 as marker in mammary neoplasia.			
D5 discloses that CD9 antigen is correlated with pancreatic cancer. In addition, overexpression of CD9 was confirmed by immunohistochemical labelling using pancreatic cancer tissue microarrays.			
D6 discloses that CD9 may play an important role in prostate cancer progression.			
D7 discloses the identification of CD9 as a potential novel biomarker of ovarian cancer.			
continued on Supplemental Box.			

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted :

The description does not comply with Rule 5.2(a) of the PCT. The description shall contain a sequence listing complying with the standard provided for in the Administrative Instructions and presented as a separate part of the description in accordance with that standard where the international application contains disclosure of one or more nucleotide and/or amino acid sequences. In the instant application, the description refers to SEQ ID NO:7 and to SEQ ID NO:8 at page 74, line 25 however a sequence listing is not present.

Figure 3 does not comply with Rule 11.13(h) of the PCT. The height of the numbers and letters shall not be less than 0.32 cm. The numbers and labels of the X and Y axes are too small.

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The description does not comply with Article 5 of the PCT. The description on page 74, lines 25 and 26 makes reference to SEQ ID NO:8 and SEQ ID NO:7 in Figure 31. However, Figure 31 does not contain said sequences.

Claims 5 to 10, 17, 24, 31, 38 and 45 to 63 are broader in scope than the teaching of the description and do not comply with Article 6 of the PCT. There is support in the description only for a monoclonal antibody (mAb) produced by the hybridoma deposited with IDAC as accession number 141204-01 that is a cancerous disease modifying antibody (CDMAB), and chimeric and humanized forms thereof. There is a lack of support in the description for any other CDMAB, or for any other mAb that binds to the same epitope as that bound by the mAb produced by the hybridoma deposited with IDAC as accession number 141204-01. Therefore, the CDMAB in claims 5 to 10, 17, 24, 31, 38, 45 to 50, 52, 53 and 60 to 63; the mAb in claims 31, 38, 51 and 54 to 59, and the isolated mAb in claims 17, 24, 25, 45 to 48, 52, 53, are broader in scope than the antibodies supported by the description.

Claims 5 to 10, 17, 24, 31, 38, 45 to 50, 52, 53 and 60 to 63 do not comply with Article 6 of the PCT. The use of the abbreviation "CDMAB" lacks clarity, and must be defined as "cancerous disease modifying antibody" at least on its first occurrence in each independent claim. Also, the mAbs whose use is claimed in claims 31 and 38 are not defined; the preamble of these claims only defines an epitope of an antigen, but fails to identify or define the mAbs whose use is sought.

Claims 5, 10, 17, 24, 31, 38, 52, 53 and 63 do not comply with Article 6 of the PCT. The use of the expressions "an ability to competitively inhibit binding" in claims 5, 10, 17, 24, 31, 38, 52, 53 and 63, "reacts with" in claim 52 and "that recognizes" in claim 52 renders the scope of the claims ambiguous. The inclusion of said expressions does not necessarily mean that the antibody specifically binds to the epitope.

Claims 10 and 17 do not comply with Article 6 of the PCT because the inclusion of "encoded by the clone" renders the scope of the claim ambiguous. The specification discloses that the deposited biological material is a hybridoma cell line and the claims should be amended to fully define said clone accordingly.

Claims 10, 17 and 24 do not comply with Article 6 of the PCT. The phrases "human tumor...in a mammal" in claims 10, 17 and 24 cause a lack of clarity, as it is not clear whether a xenograft of a human tumor in a non-human mammal, or a tumor in a human is intended.

Claims 31, 32, 34 to 39 and 41 to 44 are unclear and do not comply with Article 6 of the PCT. There are two different mAbs in independent claims 31 and 38, i.e. "the monoclonal antibodies" in the preamble and "said monoclonal antibodies" produced by the hybridoma 141204-01 which causes a lack of clarity as to which of the two are subsequently referred to in the same independent claims and claims dependent thereon by the terms "said isolated monoclonal antibody" and "said monoclonal antibody". Moreover, the term "said monoclonal antibody" lacks proper antecedent in claims 31 and 38 (line 7) if the antibody of this term refers to the "monoclonal antibodies" in the preamble of these claims, as the term on line 7 is stated in the singular, while that in the preamble is in the plural.

Claims 54 to 59 do not comply with Article 6 of the PCT because it is not clear that said "human CD9 binding fragment thereof" specifically binds the same epitope of human CD9 of the isolated mAb produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141204-01. Furthermore, claims 54 to 59 refer to SEQ ID NO's however there is no Sequence Listing in the description.

Claim 63 does not comply with Article 6 of the PCT because the use of the expression "at a particular cut-off" renders the scope of the claim ambiguous.

Claims 32 to 37 and 39 to 44 do not comply with Rule 6.4(b) of the PCT as they are improperly dependent on claims 33 and 38, respectively. Any dependent claim shall be construed as including all the limitations contained in the claim to which it refers. Claims 32 to 37 and 39 to 44 are directed to a method, while claims 33 and 38 from which they respectively depend are directed to a use.

The statement "spirit of the invention" found on page 37, line 18, of the description does not comply with Article 6 of the PCT. This is a general statement which implies that the extent of protection may be expanded in some vague and imprecise way.

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of: Box V

The problem to be solved by the present invention is the provision of novel and inventive anti-CD9 mAbs which are cytotoxic to cancerous tumour cells while simultaneously being non-toxic to non-cancerous cells.

Novelty

Claims 1 to 63 are novel and comply with Article 33(2) of the PCT. D1 is considered the closest prior art and discloses anti-CD9 mAbs which inhibit proliferation of colon carcinoma cells *in vitro* and tumour growth *in vivo*. However, D1 does not disclose an anti-CD9 mAb produced by the hybridoma cell line AR40A746.2.3 having IDAC accession no. 141204-01. Therefore, the anti-CD9 mAb produced by the hybridoma cell line AR40A746.2.3 having IDAC accession no. 141204-01, humanized and chimeric Abs derived therefrom, as well as conjugates and compositions thereof as in claims 1 to 4, 6 to 9 and 51 to 62, therapeutic methods and processes which make use thereof as in claims 5 and 10 to 46, and binding assays and kits related thereto, as in claims 47 to 50 and 63, are novel over the prior art.

Inventive Step

Claims 1, 4, 6, 51 to 54, 56 and 63 do not comply with Article 33(3) of the PCT. The subject matter of these claims would have been obvious to a person skilled in the art having regard to D1 in view of D2. D1 discloses anti-CD9 mAbs which inhibit proliferation of colon carcinoma cells *in vitro* and tumour growth *in vivo*. D2 discloses a method for the production of anti-cancer cytotoxic mAbs which is identical to the method employed for the production of anti-CD9 mAbs in the instant application. Thus, it would have been obvious to the skilled person in view of D1 to use the method of D2 to obtain the cytotoxic anti-CD9 mAbs of claims 1, 6, 51 to 54 and 56, the hybridoma of claim 4, as well as the kit of claim 63.

Claims 2, 3, 7 to 9, 47 to 50, 55 and 57 to 59 do not comply with Article 33(3) of the PCT. The subject matter of these claims would have been obvious to a person skilled in the art having regard to D1 in view of D2 and further in view of D3. D1 and D2 are as above. D3 discloses a method of producing humanized and chimerized Abs. Once in possession of the cytotoxic anti-CD9 mAbs of the instant application which are obvious with regard to D1 in view of D2, as discussed above, it would have been obvious to the skilled person to then use the method of D3 to obtain a humanized Ab thereof as in claims 2, 7, 55 and 57 to 59 as well as chimeric Abs thereof as in claims 3 and 8, and conjugates thereof in claim 9, and to use them in a binding assay as in claims 47 to 50.

Claims 5, 15, 16, 22, 23, 29, 30, 36, 37, 43, 44, 61 and 62 do not comply with Article 33(3) of the PCT. The subject matter of these claims would have been obvious to a person skilled in the art having regard to D1 in view of D2 and D3 and further in view of D4 or D5 or D6. D1, D2 and D3 are as above. D4, D5 and D6 disclose an association of CD9 with breast, pancreatic and prostate cancer, respectively. The cytotoxic anti-CD9 mAbs, and humanized and chimeric forms thereof, of the instant application are obvious with regard to D1 in view of D2 and further in view of D3, as discussed above. It would have been obvious to the skilled person to use said cytotoxic anti-CD9 mAbs, and humanized and chimeric forms thereof, in a method for initiating Ab induced cytotoxicity of cancerous cells in a tissue sample selected from human breast, pancreatic or prostate tumour as in claim 5 and in a method of reduction of human breast, pancreatic or prostate tumour as in claims 15, 16, 22, 23, 29, 30, 36, 37, 43, 44 in view of D4, D5 or D6. It would also have been obvious to the skilled person to obtain a composition effective for treating human breast, pancreatic or prostate tumour as in claims 61 and 62 in view of D4, D5 or D6.

Claims 10 to 14, 17 to 21, 24 to 28, 31 to 35, 38 to 42, 45 and 46 do not comply with Article 33(3) of the PCT. The subject matter of these claims would have been obvious to a person skilled in the art having regard to D1 in view of D2 and further in view of D4 or D5 or D6. D1, D2, D4, D5 and D6 are as above. Once in possession of the cytotoxic anti-CD9 mAbs of the instant application which are obvious with regard to D1 in view of D2, as discussed above, it would have been obvious to the skilled person to use said cytotoxic anti-CD9 mAbs in a method of reduction of human breast, pancreatic or prostate tumour as in claims 10 to 14, 17 to 21, 24 to 28, 31 to 35 and 38 to 42 and in a process for reduction of human breast, pancreatic or prostate tumour as in claims 45 and 46.

Claim 60 does not comply with Article 33(3) of the PCT. The subject matter of this claim would have been obvious to a person skilled in the art having regard to D1 in view of D2 and D3 and further in view of D4 or D5 or D6 or D7. D1, D2, D3, D4, D5 and D6 are as above. D7 discloses an association of CD9 with ovarian cancer. Once in possession of the cytotoxic anti-CD9 mAbs, and humanized and chimeric forms thereof, of the instant application which are obvious with regard to D1 in view of D2 and further in view of D3, as discussed above, it would have been obvious to the skilled person, in view of D4, D5, D6 or D7, to prepare a composition thereof effective for treating a human colon, breast, pancreatic, prostate, or ovarian tumour as in claim 60.

Industrial Applicability

The subject matter of claims 1 to 63 is considered to be industrially applicable and thus complies with the requirements of Article 33(4) of the PCT. Although claims 5 and 10 to 46 encompass methods of treatment for which this Authority is not required to establish a written opinion, the use of the products referred to therein for cancer treatment appears to represent subject matter that has industrial applicability.

**MEDIACION DE CITOTOXICIDAD DE CELULAS QUE EVIDENCIAN LA
EXPRESION SUPERFICIAL DE CD9**

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

La invención se refiere a la clasificación, diagnóstico y tratamiento de enfermedades cancerosas (tanto tumores primarios como metástasis tumorales), particularmente a la mediación de citotoxicidad de células tumorales que
10 evidencian expresión superficial de CD9, y más particularmente al uso de anticuerpos modificadores de enfermedades cancerosas (CDMAB), opcionalmente en combinación con uno o más CDMAB/agentes quimioterapéuticos, como un medio para iniciar la respuesta citotóxica. La invención se refiere
15 además a ensayos de unión, los cuales utilizan el CDMAB de la presente invención. Los anticuerpos anticáncer pueden ser conjugados a toxinas, enzimas, compuestos radioactivos, citocinas, interferones, porciones objetivo o reporteras y células hematógenas.

**MEDIACION DE CITOTOXICIDAD DE CELULAS QUE EVIDENCIAN LA
EXPRESION SUPERFICIAL DE CD9**

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al diagnóstico y
tratamiento de enfermedades cancerosas, particularmente a la
mediación de citotoxicidad de células tumorales; y más
particularmente al uso de anticuerpos modificadores de
enfermedad cancerosa (CDMAB, por sus siglas en inglés),
10 opcionalmente en combinación con uno o más CDMAB/agentes
quimioterapéuticos, como un medio para iniciar la respuesta
citotóxica. La invención se refiere además a ensayos de
unión, los cuales utilizan el CDMAB de la presente invención.

15 **Antecedentes de la invención**

La membrana celular contiene muchas proteínas de
superficie celular diferentes, algunas en movimiento y
algunas ancladas al citoesqueleto. Este amplio repertorio de
proteínas de superficie celular es capaz de ejecutar
20 funciones diferentes tales como señalización y adhesión. Se
sabe también que ciertos tipos de proteínas de membrana son
responsables de la organización de estas proteínas de
superficie celular en complejos capaces de funciones
unificadas que no podrían llevar a cabo como moléculas
25 individuales. Esta familia emergente de proteínas, las

tetraspaninas o la familia de transmembrana 4 (TM4) de proteínas de membrana integral, sirve como un facilitador molecular u organizador de complejos multi-moleculares.

Las tetraspaninas han estado implicadas en una
5 amplia variedad de procesos fisiológicos tales como
activación de células inmunes, migración celular, fusión
célula-célula (incluyendo fertilización) y varios aspectos de
diferenciación celular. Estas moléculas también han mostrado
jugar un papel en enfermedades infecciosas (por ejemplo,
10 paludismo, hepatitis C y virus de inmunodeficiencia humana) y
varios trastornos genéticos están ligados a mutaciones en
estas moléculas (por ejemplo, retraso mental ligado a X,
degeneración retinal y ensamble incorrecto de membranas de
basamento humano en el riñón y piel) (Boucheix y Rubinstein.
15 Cell. Mol. Life Sci. 58(9):1189-1205 2001). La capacidad de
las tetraspaninas para interactuar con muchas otras moléculas
de señalización y participar en activación, adhesión y
diferenciación celular se refieren todas a su papel como
"facilitadores moleculares" que agrupan grandes complejos
20 moleculares y les permiten, a través de estabilización,
funcionar más eficientemente. La interacción de las
tetraspaninas con otras moléculas de señalización es algunas
veces referida como el alma de tetraspanina.

Esta superfamilia (TM4SF) fue reconocida primero en
25 1990, cuando una comparación de las secuencias de los genes

CD37, CD81 (TAPA-1) y sm23 recién clonados con el gen asociado a tumor CD63 (ME491) (Hotta *et al.*, Cancer Res. 48(11):2955-2962 1988) reveló homología de secuencia y una estructura predicha conservada (Wright *et al.*, J Immunol 5 144(8):3195-3200 1990; Oren *et al.*, Mol. Cell. Biol 10(8):4007-4015 1990). La familia ha crecido ahora hasta aproximadamente 32 miembros en humanos (Le Naour *et al.*, Proteomics. 6(24):6447-54 2006).

CD9 es un miembro de 24 kDa de esta familia que es 10 expresado en células tanto hematopoyéticas como no hematopoyéticas. Concentraciones especialmente altas de CD9 son expresadas sobre la superficie de plaquetas y células endoteliales (Forsyth KD, Immunology 72(2):292-296 1991; Jenings *et al.*, Blood 88(10):624a 1996). También se descubrió 15 recientemente que CD9 era un miembro de la familia de complejos moleculares de superficie celular que incluyen las integrinas, otros receptores de superficie celular y otras tetraspaninas. Varios miembros de la familia TM4, incluyendo CD9, se han encontrado que se asocian con integrinas $\beta 1$ así 20 como con integrinas $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 7$ (Rubinstein *et al.*, Eur. J. Immunol. 24(12):3005-3013 1994; Nakamura *et al.*, J. Cell Biol. 12(6):1691-170 1995; Berditchevski *et al.*, Mol. Biol. Cell 7(2):13-207 1996; Radford *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 222(1):13-28 1996; Hadjiargyrou *et al.*, Neurochem 25 67(6):20-2513 196; Slupsky *et al.*, Eur J Biochem 244(1):168-

175 1997).

Con base en análisis de secuencias de ADNc, se predice que los miembros de TM4SF son cadenas de un solo polipéptido con cuatro regiones de transmembrana (TM) putativas altamente hidrófobas y dos asas extracelulares (EC) con ambos términos amino y carboxi ubicados intracelularmente. La alineación de todas las secuencias de aminoácidos de tetraspanina reveló que gran parte de la homología entre tetraspaninas está confinada a los dominios de transmembrana, los cuales contienen pocos aminoácidos polares altamente conservados (una asparagina en TM1 y un glutamato o glutamina en TM3 y TM4). Estos residuos cargados dentro de la membrana pueden interactuar unos con otros y pueden ser importantes para la estabilidad del ensamble de proteína, como se ha demostrado para el receptor de células T (Cosson et al. Nature 351(6325):414-416 1991).

También hay residuos hidrófobos conservados en los cuatro dominios de transmembrana; algunos en TM2 se encuentran en 17/18 secuencias de tetraspanina. La región corta entre TM2 y TM3 contiene dos a tres residuos cargados, incluyendo un ácido glutámico conservado. Estas homologías no son compartidas con otras familias de proteínas que también tienen cuatro dominios de transmembrana, tales como los canales iónicos regulados por ligandos, conexinas o CD20/FcERII3.

La conservación entre residuos observada en los dominios de transmembrana putativa y ciertos residuos en las asas EC, sugiere que esas proteínas llevan a cabo funciones estrechamente relacionadas (Maecker et al. FASEB J 11 (6):428-442 1997). Hay una mayor divergencia de secuencia en las asas extracelulares de tetraspanina, aunque tres cisteínas en EC2 se ubican en diferentes distancias de las regiones TM y 16/18 miembros de la familia. Dos de estas cisteínas ocurren en el motivo CCG conservado ubicado a aproximadamente 50 aminoácidos más allá de TM3. La tercera cisteína comúnmente es precedida por una glicina y está fijada a 11 aminoácidos hacia el extremo 5' de TM4. Una cuarta cisteína conservada, encontrada frecuentemente en un motivo PXSC, es colocada variablemente en EC2. Para algunos miembros de esta familia el uso de agentes reductores afecta su reconocimiento por anticuerpos indicando que ocurre enlace por disulfuro. Cuando están implicadas cisteínas se desconoce pero por lo menos dos de los residuos conservados en la EC2 están implicados en la unión por disulfuro (Tomlinson et al. Eur J Immunol 23(1): 136- 140 1993).

La mayoría de las tetraspaninas son modificadas por N-glicosilación; algunas son variablemente glicosiladas o aciladas, tales como CD9 (Seehafer et al. Biochim Biophys Acta 957(3):399- 410 1988). Los patrones de glicosilación entre diferentes tetraspaninas varían ampliamente. CD9

- contiene un sitio de glicosilación en ECI (Boucheix et al. J Biol Chem 266(1): 117-122 1991), mientras que la mayoría de las otras tetraspaninas glicosiladas contienen sitios en EC2 (Classon et al. J Exp Med 169(4): 1497- 1502). Dentro de
- 5 miembros individuales, sin embargo, la mayoría de los sitios de glicosilación se conservan entre especies. Por ejemplo, CD9 de ratón, rata, primates y vaca tienen todos los sitios de glicosilación individuales idénticos, mientras que la molécula felina ha perdido este sitio completamente.
- 10 El patrón de expresión de algunas de esas proteínas tiene distribución tisular casi ubicua (CD9, CD63, CD81, CD82) mientras que otras son altamente restringidas, por ejemplo, a células linfoides y mieloides (CD53) o células B maduras (CD37). Algunos miembros parecen ser altamente
- 15 expresados en el sistema inmunitario; más recientemente, su expresión en el sistema nervioso también ha sido apreciada. CD9 es expresada transitoriamente en mononeuronas espinales en desarrollo y otros sitios del sistema nervioso central y periférico fetal (ToLe y Patterson. Dev Dyn 197(2):94-106
- 20 1993). Está actualmente en tejidos hematopoyéticos embrionarios y fetales (Abe et al. Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi. 1989 52(4):712-20 1989; Abe J. Clin Immunol Immunopathol. 1989 51(1): 13-21 1989) y también es expresada durante el desarrollo de células B (Boucheix et al. J Biol
- 25 Chem 266(1): 117-122 1991).

La interacción de CD9 con integrinas $\beta 1$ así como con integrinas $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 7$ en particular, sugiere que la expresión de CD9 pueda influenciar muchas de las mismas funciones celulares que han sido asignadas a las integrinas.

5 CD9 y otras tetrasparinas se ha reportado que participan en la activación, adhesión y motilidad de células así como en crecimiento celular normal y tumoral (Maecker et al. FASEB J 11(6):428-442 1997). Aunque se ha sugerido que los miembros de la familia de TM4 sirven como facilitadores moleculares

10 (Maecker et al. FASEB J 11(6):428- 442 1997), su modo de influencia puede variar entre células. La transfección de CD9 en células pre-B CD9-negativas deficientemente motiles (Raji) sobre-reguló la motilidad de estas células a través de fibronectina y laminina (Shaw et al. 270(41):24092-24099

15 1995), mientras que la transfección de CD9 en líneas de células motiles y no linfoides sub-reguló su motilidad a estos componentes de matriz extracelular (Ikeyama et al. J. Exp. Med. 177, 1231-1237 1993).

La fibronectina se identificó como un ligando

20 potencial para CD9 al demostrar unión directa de fibronectina a CD9 plaquetaria inmovilizada y a CD9 recombinante (Wilkinson et al. FASEB J. 9:A1500. 23 1995). Mediante el uso de células CHO transfectadas en falso y con CD9, Cook et al., compararon la adhesión y dispersión de estas células

25 transfectadas a componentes de matriz extracelular

inmovilizados, particularmente fibronectina. Mostraron que:
 (i) la expresión superficial de CD9 modifica la adhesión de
 células CHO y dispersa la morfología en fibronectina, (ii) la
 inactivación de fibronectina con células CHO CD9 incluye
 5 principalmente el segmento de fibronectina compuesto del
 dominio de unión HEP2/IIICS y (iii) la expresión de CD9 sub-
 regula la producción de una matriz de fibronectina
 pericelular. Estos datos claramente sugieren que la expresión
 de CD9 ectópica puede regular interacciones células-
 10 fibronectina a través de la unión de CD9 a regiones
 específicas en fibronectina y a través de la modulación de
 otras moléculas de unión a fibronectina tales como $\alpha 5b1$ (Cook
et al. Exp Cell Res. 251(2):356-371).

Aunque un número de las asociaciones de
 15 tetraspaninas están ahora razonablemente bien caracterizadas
 en términos de asociación física y funcional, otras siguen
 siendo controversiales, particularmente la asociación de
 tetraspaninas y receptores de Fc (FcR). Después de la
 demostración de que anticuerpos anti-CD9 desencadenan la
 20 agregación plaquetaria, se reportó que los anticuerpos
 inducen asociación de CD9 con la integrina $\alpha IIb/\beta III$
 $GPIIb/IIIa$; CD41/CD61) en plaquetas y que el
 desencadenamiento de la agregación plaquetaria es mediado por
 $GPIIb/IIIa$ (Slupsky *et al.*, J Biol Chem. 264(21):12289-1223
 25 1989). De hecho, la inyección de anti-CD9 en monos causa

trombocitopenia letal a los 5 minutos de inyección, lo cual se previene mediante el pre-tratamiento de los monos con anticuerpos anti- α IIb/ β (Kawakatsu et al. Thromb Res. 70(3):245-254 1993). La activación plaquetaria mediada por CD9, al igual que la activación inducida por anticuerpos anti- α IIb/ β III, puede ser bloqueada por anticuerpos contra Fc γ RII sugiriendo que la activación es mediada por Fc γ RII. De hecho, los anticuerpos contra varias proteínas plaquetarias, incluyendo la tetraspanina PETA-3, inducen agregación plaquetaria que es inhibida por el bloque del receptor Fc.

Sin embargo, la vasta mayoría de estos datos describen una relación indirecta debido a que eventos de activación celular resultan de la co-ligación de tetraspaninas con FcR por medio de la región Fc de anticuerpos anti-tetraspanina intactos. Este evento es poco probable que sea de cualquier significado en fisiología normal. El hecho de que las tetraspaninas han sido identificadas tan frecuentemente como los objetivos de anticuerpos que co-ligan FcR es sugestivo de una relación espacial entre estas moléculas. La plétora de reportes de co-ligación tetraspanina-FcR ha tal vez atraído la atención a reportes más fisiológicamente relevantes que soportan esta relación, que muestra específicamente la co-localización proximal de tetraspaninas con FcR mediante inmunofluorescencia y co-inmunoprecipitación (Higginbottom et

al. 99(4):546-552 2000; Kaji et al. J Immunol 166(5):3256-3265 2001). Esta interacción facilitaría la diafonía entre FcR y moléculas de adhesión/señalización en el alma de tetraspanina que tendría un significado fisiológico claro con la biología de plaquetas y células inmunes. Que la asociación de FcR con tetraspaninas tiene efectos funcionales importantes es implicado por la demostración de la modulación dependiente de tetraspanina de señalización de FcR, tanto en complejos de co-ligación como independientemente de eventos de co-ligación.

En cáncer, estudios clínicos han reportado un enlace entre los niveles de expresión de tetraspanina y prognosis y/o metástasis. CD9 se describió inicialmente sobre la superficie de células de leucemia linfoblástica aguda de linaje B (Kersey et al., J Exp Med. 153(3):726-31 1981). Es expresada en 90 por ciento de las leucemias agudas de linaje B, y en 50 por ciento de leucemias mieloides agudas y leucemias linfoides crónicas de linaje B (Boucheix et al., Leuk Res. 9(5):597-604 1985). En particular, CD9 es un marcador constante de leucemia promielocítica aguda. La presencia en superficie de CD9 puede servir como un indicador pronóstico del potencial metastásico de algunos cánceres (Ikeyama et al. J Exp Med. 177(5): 1231-1237 1993; Miyake et al. Cancer Res. 55(18):4127-4131 1995). De hecho un alto nivel de las tetraspaninas CD9 y CD82/KAI-1 en células tumorales

está asociado con un pronóstico favorable en cánceres de seno, pulmón, colon, próstata y pancreático. Además, un nivel de expresión reducido de estas moléculas está correlacionado con metástasis en estos cánceres Boucheix y Rubinstein. Cell MoI Life Sci. 58(9):1189-1205 2001). Los niveles de CD9 comúnmente fueron más bajos en células obtenidas de metástasis de nódulos linfáticos que en células de tumor de cáncer de seno primario (Miyake et al. Cancer Res. 55(18):4127-4131 1995). Además, usando modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, CD9 y CD82 también han mostrado actuar como "supresores de metástasis" en tanto que CD151 mostró incrementar el potencial metastásico (Boucheix y Rubinstein. Cell MoI Life Sci. 58(9): 1189- 1205 2001).

Dos estudios proteómicos recientes de la composición del alma de tetraspanina en tumor y metástasis han sido reportados (Andre et al. Proteomics 6(5): 1437- 1449 2006; Le Naour et al. MoI Cell Proteomics 5(5):845-857 2006). Estos dos reportes se enfocaron ambos en cáncer de colon usando dos modelos celulares diferentes. Los modelos estuvieron constituidos de líneas de células derivadas de tumores de colon primario y metástasis de los mismos pacientes. El primer modelo estaba constituido por las líneas de células SW480 (tumor primario) y SW620 (metástasis de nódulos linfáticos) Leibovitz et al. Cancer Res 36(12):4562-4569 1976), disponible de la Colección Americana de Tipos de

Cultivos (ATCC). Los complejos de tetraspanina fueron aislados después de la purificación por inmunoafinidad y las proteínas se identificaron mediante MS usando LC-ESI-MS/MS y MALDI-FTICR.

- 5 El segundo modelo estaba constituido por las tres líneas de células Isreco1 (IS1, tumor primario), Isreco2 (IS2, metástasis hepática) e Isreco3 (IS3, metástasis peritoneal) (Cajot et al. J Biol Chem. 274(45):31903-31908 1997), establecido en el ISREC (Institut Suisse d'Etudes
- 10 Experimentales sur le Cancer, Suiza). En este estudio, las células fueron lisadas con el detergente suave Brij97 seguidas por experimentos de inmunoprecipitación de los complejos que contenían CD9. Las proteínas asociadas fueron eluidas más usando el detergente más severo Triton X-100, el
- 15 cual disocia asociaciones tetraspanina-tetraspanina. Para descartar unión no específica, se llevaron a cabo también experimentos de inmunoprecipitación usando IgG1 no relacionada que fue tratada de manera idéntica a los mAbs CD9. La identificación de proteínas se llevó a cabo mediante
- 20 espectrometría de masas.

- Un análisis comparativo de las células tumorales primarias y metástasis en los dos modelos celulares mostró que algunas proteínas eran detectadas diferencialmente. Para la mayoría de estas proteínas, la expresión diferencial se
- 25 confirmó mediante métodos cuantitativos tales como citometría

de flujo. Variaciones importantes en los niveles de expresión de varias moléculas de adhesión fueron observadas, en particular, receptores de la matriz extracelular tales como receptores de laminina. En forma interesante, la integrina $\alpha 6b4$ fue detectada por MS únicamente en complejos que contenían CD9 de metástasis. Experimentos de inmunoprecipitación y Western Blotting confirmaron que una cantidad más alta de integrina $\alpha 6b4$ fue co-inmunoprecipitada con CD9 en metástasis de ambos modelos, a pesar de un nivel de expresión similar o más bajo en la superficie celular. Por lo tanto, esto sugiere un reclutamiento específico de la integrina $\alpha 6b4$ en microdominios enriquecidos con tetraspanina durante progresión de tumor. En contraste, una reducción significativa en otros receptores de laminina, tales como integrina $\alpha 3b1$ y la proteína Ig Lu/B-CAM (molécula de adhesión de luterano/células B), se observó en líneas de células metastásicas de los dos modelos celulares usados así como en varias otras líneas de células metastásicas (Andre et al., Proteomics 6(5):1437-1449 2006).

Otra molécula de adhesión identificada por MS fue la molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM). Esta proteína es expresada en muchos tejidos epiteliales humanos y sobre-expresada en la mayoría de los carcinomas epiteliales (Armstrong y Eck. Cancer Biol Ther. 2(4):320-326 2003).

Interesantemente, se ha demostrado que EpCAM puede asociarse

directamente con la tetraspanina CD9. Así, una co-localización sustancial de estas dos moléculas en el colon normal ha sido observada, mientras que el nivel de co-localización fue más bajo en tumores primarios y metástasis (Le Naour et al. *Mol Cell Proteomics* 5(5):845-857 2006). La proteómica también ha revelado la presencia de diferentes proteasas de membrana (es decir, CD26/dipeptidil peptidasa 4 (DPPIV) expresada sólo en algunas células metastásicas) así como varias moléculas de señalización en microdominios enriquecidos con tetraspanina. Estos descubrimientos pueden emitir una nueva luz sobre la función de las tetraspaninas, sugiriendo que los microdominios pueden jugar un papel como una plataforma para actividades enzimáticas y transducción de señales.

En otro estudio proteómico Grønborg et al., demostraron el uso de método de marcado de isótopos estables con aminoácidos en cultivo de células (SILAC) para comparar las proteínas secretadas (secretoma) de células derivadas de cáncer pancreático con aquél de células del ducto pancreático no neoplásicas. Identificaron varias proteínas que no han sido correlacionadas previamente con cáncer pancreático incluyendo perlecan (HSPG2), antígeno CD9, receptor de fibronectina (integrina $\beta 1$) y una citocina nueva designada como proteína osteoblástica predicha (FAM3C). Particularmente CD9 se identificó como estando elevada en cáncer contra

normal por una relación de 8. Debido a que CD9 no se describió previamente como elevado en cáncer pancreático llevaron a cabo estudios de validación mediante inmunohistoquímica (IHC) usando microdisposiciones de tejido

5 de cáncer pancreático (TMAs). CD9 fue expresada en distribución membranosa robusta en 7 de 18 (39 por ciento) cánceres pancreáticos en la TMA sin expresión observada en parénquima pancreática normal adyacente (Grønborg et al. *Mol Cell Proteomics*. 5(1): 157-171). El marcado de CD9 demostró

10 un patrón de acentuación luminal apical similar al patrón que han reportado previamente para otras proteínas secretadas en cánceres pancreáticos tales como antígeno de células madre de próstata y mesotelina (Argani et al. *Clin Cancer Res* 7(12):3862-3868 2001; Argani et al. *Cancer Res*. 61(11):4320-

15 4324 2001). Además, el marcado de contenidos intraluminales se observó comúnmente con estructuras glandulares neoplásicas, consistente con secreción de CD9.

Los datos de cuantificación a nivel proteína obtenidos por el método SILAC fueron comparados con los datos

20 de ARNm obtenidos por un experimento de microdisposición de ADN. Antígeno CD9, el cual se demostró por SILAC que era sobre-expresado diferencialmente en el secretoma de cáncer pancreático y se confirmó como siendo sobre-expresado a nivel proteína, fue sub-regulado dos veces en células Panc1 contra

25 HPDE con base en datos de microdisposición de ADN. Estos

datos refuerzan la importancia de evaluar tanto el transcriptoma como el proteoma de cánceres humanos (Grønborg et al. *Mol Cell Proteomics*. 5(1):157-171).

En otro estudio, la expresión de CD9 se examinó en tejidos de carcinoma gástrico primario y metastásico. En total, especímenes de 78 pacientes fueron usados para tinción inmunohistoquímica y especímenes de 57 pacientes fueron sometidos a Northern blotting. La expresión de CD9 se observó tanto a nivel mensaje como a nivel proteína en tejidos de carcinoma gástrico primario, tejidos metastásicos de nódulo linfático y tejidos de diseminación peritoneal. La expresión de CD9 fue intensificada en áreas cancerosas de cánceres gástricos en comparación con áreas no cancerosas en el mismo paciente. Cuando se analizó por el estado de malignidad con base en el diagnóstico clínico patológico, hubo una tendencia de que la expresión de CD9 se observó en severa invasión de vasos, metástasis activa de nódulos linfáticos y etapa avanzada. Estos autores concluyen que la expresión de CD9 se identificó bastante en tejido de cáncer gástrico en comparación con tejidos normales. La expresión de CD9 fue más prominente en cáncer gástrico avanzado (Haruko et al. *J Surg Res*. 117(2):208-215 2004).

El papel de CD9 en la progresión de carcinoma de próstata también fue estudiado (Wang et al. *Clin Cancer Res*. 13(8):2354-2361 2007). Reducción o pérdida de la expresión de

CD9 en células neoplásicas de próstata se observó en 24 por ciento de 107 adenocarcinomas primarios localizados clínicamente, 85 por ciento de 60 adenocarcinomas primarios avanzados clínicamente, 85 por ciento de 65 metástasis en 5 nódulos linfáticos y 65 por ciento de metástasis de hueso. Esta reducción en la expresión de CD9 estuvo asociada con alteraciones de ADNc de CD9 no observadas en tejidos normales. Encontraron que todas las líneas de células derivadas de PC-3, una PIN y cuatro adenocarcinomas 10 prostáticos portaban supresiones en sus moléculas de ADNc de CD9. Estas supresiones eliminaron los nucleótidos 115 a 487, 190 a 585 ó 120 a 619 de la secuencia de codificación de CD9 de 684 pb. Así, de la proteína CD9 de 228 aminoácidos, los aminoácidos 39 a 163, 64 a 195 ó 40 a 207 fueron eliminados 15 por estas supresiones. Estas supresiones afectaron los grandes dominios extracelulares e intracelulares de la proteína. La presencia de la supresión PC-3M-LN4 (supresión 64-195) fue confirmada después de la secuenciación directa del producto de amplificación de ARNm (sin clonación). Estas 20 supresiones no fueron detectadas en ADNm genómico derivado de algunas de estas muestras, argumentando para la existencia de modificaciones de ARNm de CD9 transcripcionales. Otra supresión se detectó en la línea de células DU145, mientras que una inserción en cuadro estuvo presente en ARNm derivado 25 de PC-3M-Pro4.

Finalmente, mutaciones por puntos sin sentido comunes fueron observadas en una línea de células de carcinoma prostático (PC-3M-LN4), un espécimen de PIN y siete especímenes de adenocarcinoma prostático. Algunos especímenes

5 portaban más de una mutación sin sentido. De manera interesante, la expresión de la proteína CD9 no fue detectada en la mayoría de estos casos (excepto en un espécimen de adenocarcinoma prostático). Una sustitución de pares de bases que dio como resultado un nuevo codón de paro, ubicado en el

10 segundo dominio citoplásmico (aminoácido 83), también estuvo presente en un PIN y en dos pacientes de cáncer de próstata en donde no se detectó la proteína CD9. Aunque la expresión reducida de la proteína CD9 ha estado asociada con progresión de cáncer en diferentes tipos de tumor, este es el primer

15 reporte que implica las alteraciones en ARNm de CD9 en la inactivación de proteínas CD9.

El papel de CD9 en varias líneas de células también ha sido investigado usando anticuerpos monoclonales anti-CD9. Estos experimentos demostraron efectos en adhesión y

20 proliferación dependiendo del tipo de célula y el anticuerpo usado. Anticuerpos anti-CD9 estimularon la retracción de coágulos de fibrina por fibroblastos (Azzarone *et al.* J Cell Physiol. 125(3):420- 426 1985), indujeron adhesión homotípica en linfocitos pre-B (Masellis-Smith *et al.* J Immunol.

25 144(5):1607-1613 1990), inhibieron la motilidad de células de

adenocarcinoma pulmonar s (Miyake *et al.* J Exp Med. 174(6): 1347-1354 1991), aumentaron adherencia de neutrófilos a células endoteliales (Forsyth KD. Immunology 72(2):292-296 1991), y desarrollaron cambio de fosfatidilinositol, biosíntesis de fosfatidilinositol y fosforilación de proteína-tirosina en plaquetas humanas (Yatomi *et al.* FEBS Lett. 322(3):285-290 1993). Un anticuerpo monoclonal anti-CD9, B2C11, promovió la adhesión de un número de líneas de células de Schwann, células PC12 y células de Schwann de rata primarias (Hadjiargyrou y Patterson. J Neurosci. 15(1 Pt 2):574-583 1995). Además, este anticuerpo también estimuló la proliferación de una de las líneas de células de Schwann. En otro artículo el mismo grupo demostró además que otro anticuerpo monoclonal anti-CD9, SMRA1, incrementó la motilidad de migración en células de Schwann primarias lo cual está correlacionado con un incremento en calcio y fosfoproteínas citosólicos (Anton *et al.* J Neurosci. 15(1 Pt 2):584-95 1994). Sin embargo, ninguno de estos anticuerpos se ha reportado que haya sido probado en un modelo *in vivo* de cáncer humano.

Finalmente, un reporte reciente mostró que la expresión ectópica de CD9 en células de carcinoma de colon dio como resultado adhesión dependiente de integrina incrementada e inhibición de crecimiento celular. De acuerdo con estos efectos, el tratamiento de estas células con

anticuerpos específicos anti-CD9 dio como resultado (i) adhesión de células mediada por integrina $\beta 1$ incrementada a través de un mecanismo que incluía el agrupamiento de moléculas de integrina más que afinidad alterada; (ii) inducción de cambios morfológicos caracterizada por la adquisición de un fenotipo celular alargado; (iii) inhibición de proliferación celular sin efectos significativos en supervivencia celular; (iv) expresión incrementada de TNF- α de membrana y finalmente (v) inhibición de la capacidad tumorigénica *in vivo* en ratones desnudos. Además, a través del uso de bloqueadores selectivos de TNF- α , han demostrado que esta citocina media parcialmente los efectos anti-proliferativos de CD9 (Ovalle et al., Int J Cancer. [publicado después de impresión] 2007). Los dos anticuerpos anti-CD9 probados *in vivo*, VJ1/20 y PAINS-13, se probaron en un modelo de xenoinjerto tipo profiláctico mientras que los anticuerpos anti-CD9 descritos en la presente han demostrado eficacia en modelos de xenoinjerto tanto profilácticos como, más clínicamente relevante, modelos de xenoinjerto establecidos de cáncer humano. Además, a diferencia de VJ1/20 o PAINS-13, los anticuerpos anti-CD9 descritos en la presente han demostrado eficacia *in vivo* en más de un modelo de xenoinjerto de cáncer.

Anticuerpos Monoclonales como Terapia de Cáncer:
 cada individuo que se presenta con cáncer es único y tiene un

cáncer que es diferente de los demás cánceres al igual que la identidad de esa persona. A pesar de esto, la terapia actual trata a todos los pacientes con el mismo tipo de cáncer, en la misma etapa, de la misma manera. Por lo menos 30 por
5 ciento de estos pacientes fallarán en la terapia de primera línea, llevando entonces a rondas adicionales de tratamiento y a la probabilidad incrementada de falla del tratamiento, metástasis y finalmente, la muerte. Un enfoque superior al tratamiento sería la personalización de la terapia para el
10 individuo particular. La única terapia actual que lleva en sí misma a personalización es la cirugía. La quimioterapia y el tratamiento con radiación no pueden ser diseñados para el paciente, y la cirugía en sí misma, en la mayoría de los casos es inadecuada para producir curas.

15 Con la llegada de los anticuerpos monoclonales, la posibilidad de desarrollar métodos para la terapia personalizada se hizo más realista toda vez que cada anticuerpo puede ser dirigido a un solo epítipo. Además, es posible producir una combinación de anticuerpos que sean
20 dirigidos a la constelación de epítopos que definen únicamente el tumor de un individuo particular.

Habiendo reconocido que una diferencia significativa entre células cancerosas y normales es que las células cancerosas contienen antígenos que son específicos
25 para células transformadas, la comunidad científica ha

sostenido por mucho tiempo que anticuerpos monoclonales pueden ser diseñados para dirigirse específicamente a células transformadas al unirse específicamente a estos antígenos cancerosos; dando entonces origen a la creencia de que los anticuerpos monoclonales pueden servir como "balas mágicas" para eliminar células cancerosas. Sin embargo, se reconoce ahora ampliamente que ni un solo anticuerpo monoclonal puede servir en todos los casos de cáncer, y que los anticuerpos monoclonales pueden ser desplegados, como una clase, como tratamientos contra cáncer dirigidos. Los agentes de bloqueo aislados de acuerdo con las enseñanzas de la invención actualmente descrita han mostrado modificar el proceso de enfermedad cancerosa de una manera que es benéfica para el paciente, por ejemplo, al reducir la carga tumoral, y variadamente serán referidos en la presente como anticuerpos modificadores de enfermedades cancerosas (CDMAB) o anticuerpos "anticáncer".

Actualmente, el paciente de cáncer normalmente tiene pocas opciones de tratamiento. El enfoque de regimenes para terapia de cáncer ha producido mejoras en los índices globales de supervivencia y morbilidad. Sin embargo, para el individuo particular, estas estadísticas mejoradas no necesariamente se correlacionan con una mejora en su situación personal.

Así, si se pusiera en práctica una metodología que

hiciera posible al practicante tratar cada tumor independientemente de los demás pacientes en la misma cohorte, esto podría permitir el enfoque único de diseñar una terapia sólo para esa persona en particular. Este curso de
5 terapia, idealmente, incrementaría el índice de curas y produciría mejores resultados, satisfaciendo de esta manera una necesidad sentida por mucho tiempo.

Históricamente, el uso de anticuerpos monoclonales ha sido usado con éxito limitado en el tratamiento de
10 cánceres humanos. Linfomas y leucemias han sido tratados con plasma humano, pero hubo pocas remisiones o respuestas prolongadas. Más aún, hubo una falta de reproducibilidad y no hubo beneficio adicional en comparación con quimioterapia. Tumores sólidos tales como cánceres de seno, melanomas y
15 carcinomas de células renales también han sido tratados con sangre humana, suero de chimpancé, plasma humano y suero de caballo con resultados impredecibles e inefectivos correspondientemente.

Ha habido muchas pruebas clínicas de anticuerpos
20 monoclonales para tumores sólidos. En los 80 hubo por lo menos cuatro pruebas clínicas de cáncer de seno humano que produjeron sólo una persona que respondió de por lo menos 47 pacientes usando anticuerpos contra antígenos específicos o con base en selectividad tisular. No fue sino hasta 1998 que
25 hubo una prueba clínica exitosa usando un anticuerpo anti-

Her2/neu humanizado (Herceptin®) en combinación con cisplatino. En esta prueba 37 pacientes fueron evaluados para respuestas de los cuales aproximadamente un cuarto tuvieron un índice de respuesta parcial y un cuarto adicional tuvo
5 progresión de enfermedad menor o estable. El tiempo a progresión medio entre los que respondieron fue de 8.4 meses con una duración de respuesta media de 5.3 meses.

Herceptin® fue aprobado en 1998 para uso de primera línea en combinación con Taxol®. Los resultados de estudios
10 clínicos mostraron un incremento en el tiempo medio a progresión de enfermedad para aquellos que recibieron terapia con anticuerpo más Taxol® (6.9 meses) en comparación con el grupo que recibió solamente Taxol® (3.0 meses). Hubo también un ligero incremento en supervivencia media; 22 contra 18
15 meses para el brazo de tratamiento de Herceptin® más Taxol® contra el brazo de únicamente tratamiento con Taxol®. Además, hubo un incremento en el número de los que respondieron tanto completamente (8 contra 2 por ciento) como parcialmente (34 contra 15 por ciento) en el grupo de combinación de
20 anticuerpo más Taxol® en comparación con Taxol® solo. Sin embargo, el tratamiento con Herceptin® y Taxol® llevó a una incidencia más alta de cardiotoxicidad en comparación con el tratamiento con Taxol® solo (13 contra 1 por ciento respectivamente). Asimismo, la terapia con Herceptin® solo
25 fue efectiva para pacientes quienes sobre expresaban (según

se determinaba mediante análisis de inmunohistoquímica (IHC)) al receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (Her2/neu), un receptor que actualmente no tiene función conocida o ligando biológicamente importante; aproximadamente 5 25 por ciento de los pacientes que tienen cáncer de seno metastásico. Por lo tanto, sigue existiendo una gran necesidad no satisfecha para los pacientes con cáncer de seno. Incluso aquellos que pudieran beneficiarse del tratamiento con Herceptin® aún requerirían de quimioterapia y 10 en consecuencia aún tendrían que manejar, al menos hasta cierto grado, los efectos secundarios de este tipo de tratamiento.

Las pruebas clínicas que investigan cáncer colorrectal incluyen anticuerpos contra objetivos tanto de 15 glicoproteína como glicolípidos. Anticuerpos tales como 17-1A, el cual tiene cierta especificidad para neocarcinomas, ha sufrido pruebas clínicas Fase II en más de 60 pacientes sólo con 1 paciente habiendo tenido una respuesta parcial. En otras pruebas, el uso de 17-1A produjo solo una respuesta 20 completa y dos respuestas menores entre 52 pacientes en protocolos usando ciclofosfamida adicional. Hasta la fecha, pruebas clínicas Fase III de 17-1A no han demostrado eficacia mejorada como terapia adyuvante para cáncer de colon en etapa III. El uso de un anticuerpo monoclonal murino humanizado 25 aprobado inicialmente para formación de imágenes tampoco

produjo regresión de tumor.

Solo recientemente ha habido resultados positivos a partir de estudios clínicos en cáncer colorrectal con el uso de anticuerpos monoclonales. En 2004, ERBITUX® fue aprobado
5 para el tratamiento de segunda línea de pacientes con cáncer colorrectal metastásico que expresaba EGFR quienes eran refractarios a quimioterapia a base de irinotecano. Resultados tanto de un estudio clínico Fase II de dos brazos como de un estudio de un solo brazo mostraron que ERBITUX® en
10 combinación con el irinotecano tuvo un índice de respuesta de 23 a 15 por ciento respectivamente con un tiempo a progresión de enfermedad medio de 4.1 a 6.5 meses respectivamente. Los resultados del mismo estudio clínico Fase II de dos brazos y otro estudio de un solo brazo mostraron que el tratamiento
15 con ERBITUX® sólo dio como resultado un índice de respuesta del 11 a 9 por ciento respectivamente con un tiempo a progresión de enfermedad medio de 1.5 y 4.2 meses respectivamente.

En consecuencia, tanto en Suiza como en los Estados
20 Unidos, el tratamiento con ERBITUX® en combinación con irinotecano, y en los Estados Unidos, el tratamiento con ERBITUX® solo, ha sido aprobado como un tratamiento de segunda línea para pacientes con cáncer de colon quienes han fallado en la terapia de primera línea con irinotecano. Por
25 lo tanto, al igual que Herceptin®, el tratamiento en Suiza

sólo está aprobado como una combinación de anticuerpos monoclonales y quimioterapia. Además, el tratamiento tanto en Suiza como en Estados Unidos sólo fue aprobado para pacientes como una terapia de segunda línea. Asimismo, en 2004, 5 AVASTIN® fue aprobado para usarse en combinación con quimioterapia a base de 5-fluoruroacilo intravenoso como un tratamiento de primera línea de cáncer colorrectal metastásico. Los resultados de estudios clínicos Fase III mostraron una prolongación en la supervivencia media de 10 pacientes tratados con AVASTIN® más 5-fluoruroacilo en comparación con pacientes tratados con 5-fluoruroacilo solo (20 meses contra 16 meses respectivamente). Sin embargo, de nuevo al igual que el tratamiento con Herceptin® y ERBITUX® sólo es aprobado como una combinación de anticuerpos 15 monoclonales y quimioterapia.

También sigue habiendo resultados deficientes para cáncer de pulmón, cerebro, ovarios, pancreático, próstata y estómago. Los resultados recientes más promisorios para cáncer pulmonar no microcítico de una prueba clínica Fase II 20 en donde el tratamiento implicó un anticuerpo monoclonal (SGN-15; dox-BR96, anti-Sialil-LeX) conjugado al fármaco eliminador de células doxorubicina en combinación con el agente quimioterapéutico TAXOTERE®. TAXOTERE® es la única quimioterapia aprobada por la FDA para el tratamiento de 25 segunda línea de cáncer pulmonar. Los datos iniciales indican

una supervivencia general mejorada en comparación con TAXOTERE® solo. De los 62 pacientes que fueron reclutados para el estudio, dos tercios recibieron SGN-15 en combinación con TAXOTERE® mientras que el tercio restante recibió
5 TAXOTERE® solo. Para los pacientes que recibieron SGN-15 en combinación con TAXOTERE®, la supervivencia total media fue de 7.3 meses en comparación con 5.9 meses para pacientes que recibieron TAXOTERE® solo. La supervivencia total después de 1 año y 18 meses fue de 29 y 18 por ciento respectivamente
10 para pacientes que recibieron SNG-15 más TAXOTERE® comparada con 24 y 8 por ciento respectivamente para pacientes que recibieron TAXOTERE® solo. Se planean pruebas clínicas adicionales.

Pre-clínicamente, ha habido cierto éxito limitado
15 en el uso de anticuerpos monoclonales para melanoma. Muy pocos de estos anticuerpos han alcanzado pruebas clínicas y hasta la fecha ninguno ha sido aprobado o demostrado resultados favorables en pruebas clínicas Fase III.

El descubrimiento de fármacos nuevos para tratar
20 enfermedades es obstaculizado por la falta de identificación de objetivos relevantes entre los productos de 30,000 genes conocidos que contribuirían a la patogénesis de la enfermedad. En investigación oncológica, los objetivos de fármaco potenciales se seleccionan comúnmente simplemente
25 debido al hecho de que son sobre-expresados en células

tumorales. Los objetivos identificados de esta manera son después tamizados para su interacción con una multitud de compuestos. En el caso de terapias con anticuerpos potenciales, estos compuestos candidatos normalmente se

5 derivan de métodos tradicionales de generación de anticuerpos monoclonales de acuerdo con los principios fundamentales expuestos por Kohler y Milstein (1975, Nature, 256, 495-497, Kohler y Milstein). Células esplénicas son tomadas de ratones inmunizados con antígeno (por ejemplo, células enteras,

10 fracciones de células, antígeno purificado) y fusionadas con socios de hibridoma inmortalizados. Los hibridomas resultantes son tamizados y seleccionados para secreción de anticuerpos que se unen más ávidamente al objetivo. Muchos anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico dirigidos contra

15 células cancerosas, incluyendo Herceptin® y RITUXIMAB, se han producido usando estos métodos y seleccionado con base en su afinidad. Las fallas en esta estrategia son dobles. Primero, la elección de los objetivos adecuados para unión a anticuerpos terapéuticos o de diagnóstico es limitada por la

20 escasez de conocimiento que rodea los procesos en carcinógenos específicos de tejido y los métodos simplistas resultantes, tales como selección por sobre expresión, mediante los cuales estos objetivos son identificados. Segundo, la suposición de que la molécula de fármaco que se

25 une al receptor con la afinidad más grande normalmente tiene

la probabilidad más alta de iniciar o inhibir una señal podría no siempre ser el caso.

A pesar de cierto progreso con el tratamiento de cáncer de seno y colon, la identificación y desarrollo de
5 terapias de anticuerpo eficaces, ya sea como agentes individuales o co-tratamientos, han sido inadecuados para todos los tipos de cáncer.

Patentes anteriores:

La patente de E.U.A. No. 5,858,358 y solicitud de
10 E.U.A. No. 09/183,055 describen ambas el anticuerpo monoclonal ES5.2D8 y que reconoce CD9.

La solicitud de E.U.A. No. 10/619,323 describe el papel de CD9 en adhesión y proliferación y la región de CD9 que es reconocida por el anticuerpo monoclonal mAb7. La
15 solicitud describe también que el tratamiento de mAb7 a células de músculo liso coronarias reduce la proliferación celular *in vitro*.

La patente de E.U.A. No. 5,750,102 describe un proceso en el que células del tumor de un paciente son
20 transfectadas con genes MHC que pueden ser clonados de células o tejido del paciente. Estas células transfectadas son después usadas para vacunar al paciente.

La patente de E.U.A. No. 4,861,581 describe un proceso que comprende las etapas de obtener anticuerpos
25 monoclonales que sean específicos para el componente celular

interno de células neoplásicas y normales del mamífero pero no componentes externos, marcar el anticuerpo monoclonal, poner en contacto el anticuerpo marcado con el tejido de un mamífero que haya recibido terapia para matar células

5 neoplásicas y determinar la efectividad de la terapia al medir la unión del anticuerpo marcado al componente celular interno de las células neoplásicas degenerantes. En la preparación de anticuerpos dirigidos contra antígenos intracelulares humanos, el cesionario de la patente reconoce

10 que las células malignas representan una fuente conveniente de estos antígenos.

La patente de E.U.A. No. 5,171,665 proporciona un anticuerpo nuevo y método para su producción. Específicamente, la patente enseña la formación de un

15 anticuerpo monoclonal que tiene la propiedad de unirse fuertemente a un antígeno proteico asociado con tumores humanos, por ejemplo, aquéllos del colon y pulmón, mientras que se une a células normales a un grado mucho menor.

La patente de E.U.A. No. 5,484,596 proporciona un

20 método de terapia para cáncer que comprende remover quirúrgicamente tejido tumoral de un paciente de cáncer humano, tratar el tejido tumoral para obtener células tumorales, irradiar las células tumorales para que sean viables pero no tumorigénicas y usar estas células para

25 preparar una vacuna para el paciente capaz de inhibir la

recurrencia del tumor primario mientras se inhiben simultáneamente las metástasis. La patente enseña el desarrollo de anticuerpos monoclonales que son reactivos con antígenos superficiales de células tumorales. Como se muestra
5 en la columna 4, renglones 45 en adelante, los cesionarios de la patente utilizan células tumorales autóctonas en el desarrollo de anticuerpos monoclonales que expresan inmunoterapia específica activa en neoplasia humana.

La patente de E.U.A. No. 5,693,763 enseña un
10 antígeno de glicoproteína característico de carcinomas humanos y que no depende del tejido de origen epitelial.

La patente de E.U.A. No. 5,783,186 está dirigida a anticuerpos anti-Her2 que inducen apoptosis en células que expresan Her2, líneas de células de hibridoma que producen
15 los anticuerpos, métodos para tratar cáncer usando los anticuerpos y composiciones farmacéuticas que incluyen estos anticuerpos.

La patente de E.U.A. No. 5,849,876 describe nuevas líneas de células de hibridoma para la producción de
20 anticuerpos monoclonales contra antígenos de mucina purificados a partir de fuentes de tejido tumoral y no tumoral.

La patente de E.U.A. No. 5,869,268 está dirigida a un método para generar un linfocito humano que produce un
25 anticuerpo específico para un antígeno deseado, un método

para producir un anticuerpo monoclonal, así como anticuerpos monoclonales producidos mediante el método. La patente está dirigida particularmente a la producción de un anticuerpo monoclonal humano anti-HD útil para el diagnóstico y
5 tratamiento de cánceres.

La patente de E.U.A. No. 5,869,045 se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, conjugados de anticuerpo e inmunotoxinas de cadena individual reactivos con células de carcinoma humano. El mecanismo mediante el cual
10 estos anticuerpos funcionan es doble, toda vez que las moléculas son reactivas con los antígenos de membrana celular presentes sobre la superficie de carcinomas humanos, y además porque los anticuerpos tienen la capacidad de internarse dentro de las células de carcinoma, después de la unión,
15 haciéndolos especialmente útiles para formar conjugados anticuerpo-fármaco y anticuerpo-toxina. En su forma no modificada los anticuerpos también manifiestan propiedades citotóxicas a concentraciones específicas.

La patente de E.U.A. No. 5,780,033 describe el uso
20 de autoanticuerpos para terapia y profilaxis de tumores. Sin embargo, este anticuerpo es un autoanticuerpo antinuclear de un mamífero envejecido. En este caso, se dice que el autoanticuerpo es un tipo de anticuerpo natural encontrado en el sistema inmunitario. Debido a que el autoanticuerpo
25 proviene de un "mamífero envejecido", no existe la necesidad

de que el autoanticuerpo en realidad provenga del paciente que esté siendo tratado. Además, la patente describe un autoanticuerpo antinuclear natural y monoclonal de un mamífero envejecido, y una línea de células de hibridoma que
5 produce un autoanticuerpo antinuclear monoclonal.

Breve descripción de la invención

Esta solicitud utiliza metodología para producir anticuerpos anticáncer específicos de pacientes mostrados en
10 la patente de E.U.A. 6,180,357 para aislar líneas de células de hibridoma que codifican para anticuerpos monoclonales modificadores de enfermedad cancerosa. Estos anticuerpos pueden elaborarse específicamente para un tumor y de esta manera hacer posible la personalización de terapia de cáncer.
15 Dentro del contexto de esta solicitud, anticuerpos anticáncer que tienen ya sea propiedades de eliminación de células (citotóxicas) o de inhibición de crecimiento celular (citostáticas) serán en adelante referidos como citotóxicos. Estos anticuerpos se pueden usar para ayudar en la formación
20 de etapas y diagnóstico de un cáncer, y se pueden usar para tratar metástasis tumorales. Estos anticuerpos también se pueden usar para la prevención de cáncer por medio de tratamiento profiláctico. A diferencia de anticuerpos generados de acuerdo con paradigmas de descubrimiento de
25 fármacos tradicionales, los anticuerpos generados de esta

manera pueden dirigirse a moléculas y vías que previamente no mostraron ser integrales para el crecimiento y/o supervivencia de tejido maligno. Además, las afinidades de unión de estos anticuerpos son adecuadas a los requerimientos para el inicio de los eventos citotóxicos que podrían no ser viables para interacciones de afinidad más fuerte. También, está dentro del alcance de esta invención conjugar modalidades quimioterapéuticas estándares, por ejemplo, radionúclidos, con el CDMAB de la presente invención, enfocándose de esta manera en el uso de estos quimioterapéuticos. El CDMAB también se puede conjugar a toxinas, porciones citotóxicas, enzimas, por ejemplo, enzimas conjugadas a biotina, citocinas, interferones, porciones objetivo o reporteras o células hematógenas, formando de esta manera un conjugado de anticuerpos. El CDMAB se puede usar solo o en combinación con uno o más CDMAB/agentes quimioterapéuticos.

El prospecto de tratamiento anticáncer individualizado traerá consigo un cambio en la manera en que un paciente es manejado. Un escenario clínico probable es que una muestra de tumor se obtenga en el momento de la presentación, y se embanque. A partir de esta muestra, el tumor puede ser tipificado de un panel de anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa preexistentes. El paciente será clasificado convencionalmente pero los

anticuerpos disponibles pueden ser de uso en clasificaciones adicionales del paciente. El paciente puede ser tratado inmediatamente con los anticuerpos existentes, y un panel de anticuerpos específicos para el tumor puede producirse ya sea

5 usando los métodos delineados en la presente o a través del uso de bibliotecas de despliegue de fagos en conjunto con los métodos de tamizado descritos en la presente. Todos los anticuerpos generados serán añadidos a la biblioteca de anticuerpos anticáncer ya que existe una posibilidad de que

10 otros tumores puedan portar algunos de los mismos epítomos que uno que esté siendo tratado. Los anticuerpos producidos de acuerdo con este método pueden ser útiles para tratar enfermedades cancerosas en cualquier número de pacientes que tengan cánceres que se unan a estos anticuerpos.

15 Además de anticuerpos anticáncer, el paciente puede seleccionar recibir las terapias actualmente recomendadas como parte de un régimen multimodal de tratamiento. El hecho de que los anticuerpos aislados mediante la presente metodología sean relativamente no tóxicos para células no

20 cancerosas permite que se usen combinaciones de anticuerpos a altas dosis, ya sea solas, o en conjunto con terapia convencional. El alto índice terapéutico también permitirá el retratamiento en una escala de tiempo corta que debe reducir la probabilidad de emergencia de células resistentes a

25 tratamiento.

Si el paciente es refractario al curso inicial de terapia o se desarrollan metástasis, el proceso de generar anticuerpos específicos para el tumor puede repetirse para el retratamiento. Además, los anticuerpos anticáncer pueden ser

5 conjugados a glóbulos rojos obtenidos de ese paciente y reinfundidos para el tratamiento de metástasis. Ha habido pocos tratamientos efectivos para cáncer metastásico y las metástasis normalmente presagian un resultado deficiente dando como resultado la muerte. Sin embargo, los cánceres

10 metastásicos normalmente están bien vascularizados y el suministro de anticuerpos anticáncer por glóbulos rojos puede tener el efecto de concentrar los anticuerpos en el sitio del tumor. Incluso antes de las metástasis, la mayoría de las células cancerosas dependen del suministro de sangre del

15 huésped para su supervivencia y un anticuerpo anticáncer conjugado a glóbulos rojos puede ser efectivo contra tumores *in situ* también. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser conjugados a otras células hematógenas, por ejemplo, linfocitos, macrófagos, monocitos, células asesinas

20 naturales, etc.

Existen cinco clases de anticuerpos y cada uno está asociado con una función que es conferida por su cadena pesada. Se cree generalmente que la eliminación de células cancerosas por anticuerpos desnudos es mediada ya sea a

25 través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

(ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Por ejemplo anticuerpos IgM e IgG2a de murino pueden activar complemento humano al unirse al componente C-1 del sistema de complemento activando de esta manera la vía clásica de
5 activación de complemento que puede llevar a lisis de tumor. Para anticuerpos humanos los anticuerpos de activación de complemento más efectivos son generalmente IgM e IgG1. Anticuerpos de murino del isotipo IgG2a e IgG3 son efectivos para reclutar células citotóxicas que tengan receptores Fc
10 las cuales lleven a eliminación celular por monocitos, macrófagos, granulocitos y ciertos linfocitos. Los anticuerpos humanos del isotipo tanto IgG1 como IgG3 median ADCC.

La citotoxicidad mediada a través de la región Fc
15 requiere la presencia de células efectoras, sus receptores correspondientes, o proteínas por ejemplo, células NK, células T y complemento. En ausencia de estos mecanismos efectores, la porción Fc de un anticuerpo es inerte. La porción Fc de un anticuerpo puede conferir propiedades que
20 afecten la farmacocinética de un anticuerpo *in vivo*, pero *in vitro*, esto no es operativo.

Los ensayos de citotoxicidad bajo los cuales se prueban los anticuerpos no tienen ninguno de los mecanismos efectores presentes, y se llevan a cabo *in vitro*. Estos
25 ensayos no tienen células efectoras (células NK, macrófagos o

células T) o complemento presente. Ya que estos ensayos son definidos completamente por lo que se añade junto, cada componente puede ser caracterizado. Los ensayos usados en la presente contienen sólo células objetivo, medios y sueros.

- 5 Las células objetivo no tienen funciones efectoras toda vez que son células cancerosas o fibroblastos. Sin células exógenas que tengan propiedades de función efectora no hay elementos celulares que tengan esta función. El medio no contiene complemento o ninguna célula. Los sueros usados para
- 10 soportar el crecimiento de las células objetivo no tienen actividad de complemento como se describe por los vendedores. Más aún, en nuestros propios laboratorios hemos verificado la ausencia de la actividad de complemento en los sueros usados. Por lo tanto, nuestro trabajo evidencia el hecho de que los
- 15 efectos de los anticuerpos se deben completamente a los efectos de la unión a antígeno que es mediada a través del Fab. Efectivamente, las células objetivo están buscando e interactuando sólo con el Fab, ya que no tienen receptores para el Fc. No obstante, el hibridoma está secretando
- 20 inmunoglobulina completa la cual se probó con las células objetivo, la única parte de la inmunoglobulina que interactúa con las células son el Fab, el cual actúa como fragmentos de unión a antígeno.

- Con respecto a los anticuerpos y fragmentos de
- 25 unión a antígeno actualmente reclamados, la solicitud,

presentada originalmente, ha demostrado citotoxicidad celular evidenciada por los datos de la figura 1. Como se indicó arriba, y como se confirma en la presente mediante evidencia objetiva, este efecto se debió completamente a la unión por el Fab a las células tumorales.

Existe amplia evidencia en la técnica de anticuerpos que median citotoxicidad debido a la unión directa del anticuerpo al antígeno objetivo independientemente de los mecanismos efectores reclutados por el Fc. La mejor evidencia de esto es experimentos *in vitro* los cuales no tienen células complementarias, o complemento (para excluir formalmente esos mecanismos). Estos tipos de experimentos han sido llevados a cabo con inmunoglobulina completa, o con fragmentos de unión a antígeno tales como fragmentos $F(ab')_2$. En estos tipos de experimentos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden inducir directamente apoptosis de células objetivo tal como en el caso de anticuerpos anti-Her2 y anti-EGFR, ambos de los cuales tienen anticuerpos que son aprobados por la FDA de Estados Unidos para comercialización en terapia de cáncer.

Otro mecanismo posible de eliminación de cáncer mediado por anticuerpos puede ser a través del uso de anticuerpos que funcionen para catalizar la hidrólisis de varios enlaces químicos en la membrana celular y sus glicoproteínas o glicolípidos asociados, llamados anticuerpos

catalíticos.

Existen tres mecanismos adicionales de eliminación de células cancerosas mediada por anticuerpos. El primero es el uso de anticuerpos como una vacuna para inducir a que el
5 cuerpo produzca una respuesta inmune contra el antígeno putativo que resida en la célula cancerosa. El segundo es el uso de anticuerpos para dirigirse a receptores de crecimiento e interferir con su función o para subregular ese receptor de tal manera que su función se pierda efectivamente. El tercero
10 es el efecto de estos anticuerpos en la ligación directa de porciones de superficie celular que podría llevar a muerte celular directa, tal como la ligación de receptores de muerte tales como TRAIL R1 o TRAIL R2, o moléculas de integrina tales como alfa V beta 3 y similares.

15 La utilidad clínica de un fármaco para cáncer se basa en el beneficio del fármaco bajo un perfil de riesgo aceptable para el paciente. En terapia para el cáncer la supervivencia ha sido generalmente el beneficio más buscado, sin embargo existe un número de otros beneficios bien
20 reconocidos además de prolongar la vida. Estos otros beneficios, cuando el tratamiento no afecta adversamente la supervivencia, incluyen paliación de síntomas, protección contra eventos adversos, prolongación en tiempo a recurrencia o supervivencia libre de enfermedad, y prolongación en tiempo
25 a progresión. Estos criterios son aceptados generalmente

cuerpos reguladores tales como la administración de fármacos y alimentos de Estados Unidos (FDA) aprueban fármacos que producen estos beneficios (Hirschfeld et al. Critical Reviews in Oncology/Hematology 42:137-143 2002). Además de estos

5 criterios se reconoce bien que existen otros criterios que pueden presagiar estos tipos de beneficios. En parte, el proceso de aprobación acelerado concedido por la U.S. F.D.A. reconoce que existen sustitutos que es muy probable que predigan beneficios para el paciente. A partir de finales del

10 2003, ha habido dieciséis fármacos aprobados bajo este proceso, y de estos, cuatro han obtenido aprobación completa, es decir, estudios de seguimiento han demostrado beneficios directos para pacientes como se predice por los criterios de sustitutos. Un criterio importante para determinar efectos de

15 fármaco en tumores sólidos es la evaluación de la carga tumoral al medir la respuesta al tratamiento (Therasse et al. Journal of the National Cancer Institute 92(3):205-216 2000). Los criterios clínicos (criterios RECIST) para esta evaluación han sido promulgados por los criterios de

20 evaluación de respuesta en el grupo de trabajo de tumores sólidos, un grupo de expertos internacionales en cáncer. Los fármacos con un efecto demostrado en carga tumoral, como se muestra por respuestas objetivas de acuerdo con los criterios RECIST, en comparación con el grupo de control adecuado

25 tienden a, finalmente, producir beneficio directo para el

paciente. En escenario preclínico la carga tumoral generalmente es más directa de evaluar y documentar. Ya que estudios preclínicos pueden ser trasladados al escenario clínico, los fármacos que producen supervivencia prolongada

5 en modelos preclínicos tienen la utilidad clínica anticipada más grande. En forma análoga a producir respuestas positivas a tratamiento clínico, fármacos que reducen carga tumoral en el escenario preclínico también puede tener impacto directo significativo en la enfermedad. Aunque la prolongación de

10 supervivencia es el resultado clínico más buscado a partir de tratamiento con fármacos para cáncer, existen otros beneficios que tienen utilidad clínica y es claro que la reducción de la carga tumoral, lo cual puede correlacionarse con una reducción en la progresión de la enfermedad, extiende

15 la supervivencia o ambos, también puede llevar a beneficios directos y tener impacto clínico (Eckhardt et al. Developmental Therapeutics: Successes and Failures of Clinical Trial Designs of Targeted Compounds; ASCO Educational Book, 39^a Annual Meeting, 2003, páginas 209-219).

20 La presente invención describe el desarrollo y uso de AR40A746.2.3 identificado por su efecto en un ensayo citotóxico en un modelo animal de cáncer humano. Esta invención describe reactivos que se unen específicamente a un epítipo o epítipos presentes en la molécula objetivo, y que

25 tienen también propiedades citotóxicas *in vitro*, como un

anticuerpo desnudo, contra células tumorales malignas pero no células normales, y los cuales también median directamente, como un anticuerpo desnudo, la inhibición de crecimiento de tumores. Un avance más es el uso de anticuerpos anticáncer
5 tales como este para dirigirse a tumores que expresan marcadores de antígenos cognados para lograr inhibición de crecimiento tumoral, y otros criterios positivos de tratamiento para cáncer.

En general, esta invención se refiere al uso del
10 antígeno AR40A746.2.3 como un objetivo para un agente terapéutico, que cuando se administra puede reducir la carga tumoral de un cáncer que expresa el antígeno en un mamífero. Esta invención enseña también el uso de CDMAB (AR40A746.2.3), y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y ligandos
15 inductores de citotoxicidad de los mismos, para dirigirse a su antígeno y reducir la carga tumoral de un cáncer que exprese el antígeno en un mamífero. Además, esta invención enseña también el uso de detectar el antígeno AR40A746.2.3 en células cancerosas que pueden ser útiles para el diagnóstico,
20 predicción de terapia y pronóstico de mamíferos que porten tumores que expresen este antígeno.

En consecuencia, un objetivo de la invención es utilizar un método para producir anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa (CDMAB) desarrollados contra células
25 cancerosas derivadas de un individuo particular, o una o más

líneas de células cancerosas particulares, CDMAB que son citotóxicos con respecto a células cancerosas pero que simultáneamente son relativamente no tóxicos para células no cancerosas, para de esta manera aislar líneas de células de
5 hibridoma y los anticuerpos monoclonales aislados correspondientes y fragmentos de unión a antígeno de los mismos para los cuales estas líneas de células de hibridoma sean codificadas.

Un objetivo adicional de la invención es enseñar
10 anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa, ligandos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Un objetivo adicional de la presente invención es producir anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa cuya citotoxicidad sea mediada a través de toxicidad celular
15 dependiente de anticuerpos.

Un objetivo más de la presente invención es producir anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa cuya citotoxicidad sea mediada a través de citotoxicidad celular dependiente de complemento.

20 Un objetivo más de la presente invención es producir anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa cuya citotoxicidad sea una función de su capacidad para catalizar hidrólisis de enlaces químicos celulares.

Un objetivo adicional de la presente invención es
25 producir anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa

que sean útiles para un ensayo de unión para diagnóstico, pronóstico y monitoreo de cáncer.

Otros objetivos y ventajas de esta invención se harán aparentes a partir de la siguiente descripción en la que se muestran, a manera de ilustración y ejemplo, ciertas modalidades de esta invención.

Breve descripción de las figuras

El archivo de patente o solicitud contiene por lo menos un dibujo ejecutado a color. Copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color serán proporcionadas por la oficina luego de una solicitud y pago de la tarifa necesaria.

La figura 1 compara los niveles porcentuales de citotoxicidad de unión de los sobrenadantes de hibridoma contra líneas de células PC-3, LnCap y CCD-27sk.

La figura 2 representa la unión de AR40A746.2.3 a líneas de células cancerosas y normales. Los datos son tabulados para presentar la intensidad de fluorescencia media como un incremento por veces sobre el control de isotipo.

La figura 3 incluye histogramas FACS representativos de AR40A746.2.3 y anticuerpos anti-EGFR dirigidos contra varias líneas de células cancerosas y no cancerosas.

La figura 4 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 en

el crecimiento de tumores en un modelo de cáncer pancreático BxPC-3 profiláctico. Las líneas punteadas verticales indican el periodo durante el cual el anticuerpo fue administrado. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

5 La figura 5 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 en el peso corporal en un modelo de cáncer pancreático BxPC-3 profiláctico. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

10 La figura 6 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 en el crecimiento de tumores en un modelo de cáncer pancreático BxPC-3 establecido. Las líneas punteadas verticales indican el periodo durante el cual el anticuerpo fue administrado. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

15 La figura 7 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 en el peso corporal en un modelo de cáncer pancreático BxPC-3 establecido. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

20 La figura 8 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 en el crecimiento de tumor en un modelo de cáncer de seno MDA-MB-231 establecido. Las líneas punteadas verticales indican el periodo durante el cual el anticuerpo fue administrado. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

25 La figura 9 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 en el peso corporal en un modelo de cáncer de seno MDA-MB-231 establecido. Los puntos de datos representan la media $\pm$

SEM.

La figura 10 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 en el crecimiento de tumor de una manera dependiente de dosis en un modelo de cáncer pancreático BxPC-3. Las líneas punteadas
5 verticales indican el periodo durante el cual el anticuerpo fue administrado. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

La figura 11 demuestra el efecto de varias dosis de AR40A746.2.3 en el peso corporal en un modelo de cáncer
10 pancreático BxPC-3. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

La figura 12 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 y $F(ab')_2$ de AR40A746.2.3 en crecimiento de tumor en un modelo de cáncer pancreático BxPC-3 humano establecido. Las líneas
15 punteadas verticales indican el periodo durante el cual el anticuerpo fue administrado intraperitonealmente. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

La figura 13 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 y $F(ab')_2$ de AR40A746.2.3 en el peso corporal de ratones en un
20 modelo de cáncer pancreático BxPC-3 establecido. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

La figura 14 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 y 80 mg/kg de gemcitabina solos y en combinación en el crecimiento de tumor medio en un modelo de cáncer (BxPC-3)
25 pancreático humano establecido.

La figura 15 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 y 160 mg/kg de gemcitabina solos y en combinación en el crecimiento tumoral promedio en un modelo de cáncer (BxPC-3) pancreático humano establecido.

5 La figura 16 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 y 80 mg/kg de gemcitabina solos y en combinación en la supervivencia de ratones en un modelo de cáncer pancreático (BxPC-3) humano establecido.

La figura 17 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 y 10 160 mg/kg de gemcitabina solos y en combinación en la supervivencia de ratones en un modelo de cáncer pancreático (BxPC-3) humano establecido.

La figura 18 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 y 80 mg/kg de gemcitabina solos y en combinación en el peso 15 corporal de ratones en un modelo de cáncer pancreático BxPC-3 establecido.

La figura 19 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 y 160 mg/kg de gemcitabina solos y en combinación en el peso corporal de ratones en un modelo de cáncer pancreático BxPC-3 20 establecido.

La figura 20 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 en el crecimiento de tumores en un modelo de adenocarcinoma de seno humano MDA-MB-231 profiláctico. Las líneas punteadas verticales indican el periodo durante el cual el anticuerpo 25 fue administrado intraperitonealmente. Los puntos de datos

representan la media +/- SEM.

La figura 21 demuestra el efecto de AR40A746.2.3 en el peso corporal de ratones en un modelo de adenocarcinoma de seno MDA-MB-231. Los puntos de datos representan la media +/-
5 SEM.

Las figuras 22A-22B tabulan una comparación IHC de AR40A746.2.3 en varias secciones de tejido normal humano de una microdisposición de tejidos.

Las figuras 23A-23C tabulan una comparación IHC de
10 AR40A746.2.3 en varias secciones de tejido normales y tumorales humanas de dos microdisposiciones de tejido humanas.

La figura 24 son micrografías representativas que muestran el patrón de unión obtenido con AR40A746.2.3 en
15 tejido tumoral de carcinoma de células transicionales de riñón humano (A) o tejido de riñón humano normal (B) y en tejido de tumor de carcinoma de células escamosas esofágico humano (C) o tejido esofágico humano normal (D) a partir de microdisposiciones de tejido normal y tumoral humano. La
20 ampliación es 200X.

La figura 25 tabula una comparación IHC de AR40A746.2.3 en varias secciones de tejido de tumor pancreático humano a partir de una microdisposición de tejidos.

25 La figura 26 son micrografías representativas que

muestran el patrón de unión obtenido con AR40A746.2.3 en adenocarcinoma pancreático (A) o tejido pancreático humano normal (B) de una microdisposición de tejido de tumor pancreático y normal humano. La ampliación es 200X.

5 La figura 27 tabula una comparación IHC de AR40A746.2.3 en varias especies de secciones de tejido normal de varias microdisposiciones de tejido.

La figura 28 son micrografías representativas que muestran el patrón de unión obtenido con AR40A746.2.3 en
10 tejido de bazo normal a partir de humano (A), macaco (B), mono rhesus (C) o conejo (D) de varias microdisposiciones de especies. AR40A746.2.3 se unió a linfocitos y endotelio de sinusoides esplénicos de humano, macaco, rhesus y conejo. La ampliación es 200X.

15 La figura 29 es una SDS-PAGE de productos de inmunoprecipitación. El carril 1 contiene el material inmunoprecipitado por AR40A746.2.3, el carril 2 contiene el material inmunoprecipitado por control de isotipo IgG1 (clon 1B7.11) y el carril 3 contiene estándar de peso molecular. La
20 banda de 25 kDa inmunoprecipitada por AR40A746.2.3 se indica por la flecha.

La figura 30 es una perspectiva general de los espectros calibrados de digestiones tripticas del inmunoprecipitado de AR40A746.2.3 e IgG1 (clon 1B7.11). Los
25 picos específicos para la digestión del inmunoprecipitado de

AR40A746.2.3 son marcados con pesos moleculares.

La figura 31 son Western Blots de proteínas sondeadas con AR40A746.2.3 (Panel A), anti-CD9 (clon MEM-61; Panel B) y control de isotipo IgG1 (clon 1B7.11; Panel C).

5 Carril 1: inmunoprecipitado de AR40A746.2.3, carril 3: inmunoprecipitado de anti-CD9 (clon MEM-61), carril 4: inmunoprecipitado de control de isotipo IgG1 (clon 1B7.11, carril 5: lisado de BxPC-3 (20 microgramos) y carril 6: marcador de peso molecular (pesos moleculares en kDa se

10 listan aparte de cada banda).

La figura 32 muestra una lista de cebadores usados para la amplificación por PCR de las cadenas pesada y ligera de AR40A746.2.3.

La figura 33 es la secuencia de proteínas de las

15 cadenas pesada y ligera de AR40A746.2.3. Las regiones CDR están subrayadas y resaltadas en azul.

La figura 34 es una lista de cinasas cuya fosforilación es afectada por tratamiento de células BxPC-3 tratadas con AR40A746.2.3 seguidas por estimulación de suero

20 complemento.

La figura 35 es una lista de RTKs cuya fosforilación es afectada por tratamiento de células BxPC-3 tratadas con AR40A746.2.3 seguidas por estimulación con suero y complemento.

25 La figura 36 representa los efectos apoptóticos

totales del anticuerpo AR40A746.2.3 de murino en la línea de células pancreáticas BxPC-3 24 y 40 horas después obtenidas por experimentos de tinción con Anexina-V.

5

Descripción detallada de la invención

En general, las siguientes palabras o frases tienen la definición indicada cuando se usa en la breve descripción, descripción, ejemplos y reivindicaciones.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más
10 amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes, anticuerpos desinmunizados, murinos, quiméricos o humanizados), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos de
15 cadena individual, dicuerpos, tricuerpos, inmunoconjugados y fragmentos de anticuerpo (véase abajo).

El término "anticuerpo monoclonal" según se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es
20 decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren naturalmente que pudieran estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un solo sitio
25 antigénico. Más aún, en contraste con la preparación de

anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal es dirigido contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son adecuados toda vez que pueden ser sintetizados sin contaminar por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como se está obteniendo a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no se debe considerar como requiriendo la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden elaborarse mediante el método de hibridoma (murino o humano) descrito primero por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975) o pueden elaborarse por medio de métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, patente de E.U.A. No 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden ser aislados de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

"Fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, de preferencia que comprende la región de unión a antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen menos que anticuerpos de

longitud completa, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; dicuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de una sola cadena; anticuerpos de cadena individual, moléculas de anticuerpo de un solo dominio, proteínas de fusión, 5 proteínas recombinantes y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de la cadena ligera (C_L) y dominios constantes de 10 la 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 nativa humanos) o variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. De preferencia, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones 15 efectoras.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, anticuerpos intactos pueden ser asignados a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, 20 IgE, IgG e IgM, y varios de éstos pueden dividirse más en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos son llamados α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de 25 subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes

clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

Las "funciones efectoras" de un anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una secuencia de aminoácidos o región Fc de
5 secuencia nativa o región Fc variante) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen unión a Clq; citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; subregulación de receptores
10 de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc.

"Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo" y "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la cual células citotóxicas no específicas que
15 expresan receptores Fc (FcRs) (por ejemplo, células Asesinas Naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido sobre una célula objetivo y causan subsecuentemente la lisis de la célula objetivo. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan FcγRIII
20 únicamente, en tanto que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, un ensayo ADCC *in vitro*, tal
25 como aquél descrito en la patente de E.U.A. No. 5,500,362 ó

5,821,337 puede ser llevado a cabo. Las células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Asesinas Naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la
5 molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquél descrito en Clynes et al, PNAS (E.U.A.) 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y llevan a cabo funciones efectoras. De
10 preferencia, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo función efectora de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células Asesinas Naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; con PBMCs y
15 células NK siendo preferidas. Las células efectoras pueden ser aisladas a partir de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMCs como se describe en la presente.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un
20 anticuerpo. El FcR que se prefiere es un FcR humano de secuencia nativa. Más aún, un FcR que se prefiere es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y como alternativa formas
25 empalmadas de estos receptores. Los receptores de FcγRII

incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), los cuales tienen secuencias de aminoácido similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. El FcγRIIA receptor de

5 activación contiene un motivo de activación a base de tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El FcγRIIB receptor de inhibición contiene un motivo de inhibición a base de tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico. (Véase revisión M. en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcRs son revisados en

10 Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo aquellos que se identificaron en el futuro, son abarcados por

15 el término "FcR" en la presente. El término incluye también el receptor neonato, FcRn, el cual es responsable por la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *Eur. J. Immunol.* 24:2429 (1994)).

20 "Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula para lisar un objetivo en presencia de un complemento. La vía de activación de complemento es iniciada por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo,

25 un anticuerpo) complejada con un antígeno cognado. Para

evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo CDC, por ejemplo como el descrito en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

El término "variable" se refiere al hecho de que
5 ciertas porciones de los dominios variables difieren
extensamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la
unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su
antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no es
distribuida uniformemente a lo largo de los dominios
10 variables de anticuerpo. Se concentra en tres segmentos
llamados regiones hipervariables tanto en los dominios
variables de la cadena ligera como la cadena pesada. Las
porciones más altamente conservadas de dominios variables son
llamadas las regiones estructurales (FRs). Los dominios
15 variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprende cada
uno cuatro Frs, adoptando ampliamente una configuración de
láminas β , conectada por tres regiones hipervariables, las
cuales forman asas que conectan, y en algunos casos forman
parte de, la estructura de láminas β . Las regiones
20 hipervariables en cada cadena se unen juntas en cercana
proximidad por las FRs y, con las regiones hipervariables de
la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión
a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences
of Proteins of Immunological Interest*. 5ª Edición, Public
25 Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

(1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable" cuando se usa en la presente se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables por la unión a antígenos. La región hipervariable generalmente comprende los residuos de aminoácido de una "región de determinación de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5ª Edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) y/o aquellos residuos de un "asa hipervariable" (por ejemplo los residuos 2632 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los residuos de "región estructural" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable que no son los residuos de la región hipervariable como la definida en la presente. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno

idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que
5 tiene dos sitios de unión a antígeno y aún es capaz de reticular antígenos.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un
10 dominio de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha y no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las seis
15 regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígenos al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígenos, aunque a una
20 afinidad más baja que el sitio de unión completo. El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH 1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de pocos residuos en el término carboxi
25 del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más

cisteínas de la región de pivote del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente para Fab' en la cual los residuos de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo
5 F(ab')₂ originalmente fueron producidos como pares de fragmentos Fab' los cuales tienen cisteínas de pivote entre ellos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo se conocen también.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos se forman de
10 cualquier especie vertebrada pueden ser asignadas a uno de dos tipos distintos claramente, llamados kappa (κ) y lambda (λ), con base en las secuencias de aminoácidos de estos dominios constantes.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena
15 individual" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptidos. De preferencia, el polipéptido Fv comprende además un enlazador de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L que hace posible que el scFv forme la
20 estructura deseada para unión a antígenos. Para una revisión de scFv véase Plückthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Morre eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

El término "dicuerpos" se refiere a fragmentos de
25 anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno,

fragmentos que comprenden un dominio pesado variable (V_H) conectado a un dominio ligero variable (V_L) en la misma cadena de polipéptidos (V_H - V_L). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareo entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a 5 aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los dicuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc Natl. Acad. Sci. E.U.A* 10 90:6444-6448 (1993).

El término "tricuerpos" o "trímeros trivalentes" se refiere a la combinación de tres anticuerpos de cadena individual. Los tricuerpos están contruidos con el término de aminoácido de un dominio V_L o V_H , es decir, sin una 15 secuencia enlazadora. Un tricuerpo tiene tres cabezas Fv con los polipéptidos dispuestos en una forma cíclica y de cabeza a cola. Una conformación posible del tricuerpo es plana con los tres sitios de unión ubicados en un plano a un ángulo de 120 grados uno de otro. Los tricuerpos pueden ser 20 monoespecíficos, biespecíficos o triespecíficos.

Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de este ambiente natural son materiales que interferirían con usos de 25 diagnóstico terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir

enzimas, hormonas y otros solutos proteínáceos o no proteínáceos. Anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* con células recombinantes toda vez que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará
5 presente. Ordinariamente, sin embargo, anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés, por ejemplo, antígeno CD59, es uno capaz de unirse a ese antígeno con afinidad suficiente de tal manera que el
10 anticuerpo sea útil como un agente terapéutico o de diagnóstico para dirigirse a una célula que exprese el antígeno. Cuando el anticuerpo es uno que se une a CD59, normalmente se unirá de preferencia a CD59 a diferencia de otros receptores, y no incluye unión accidental tal como
15 contacto Fc no específico, o unión a modificaciones después de traducción común a otros antígenos y puede ser uno que no reaccione en forma cruzada significativamente con otras proteínas. Los métodos para la detección de un anticuerpo que se une a un antígeno de interés se conocen bien en la técnica
20 y pueden incluir pero no están limitados a ensayos tales como FACS, ELISA de células y Western Blot.

Según se usa en la presente, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo de células" se usan indistintamente, y todas estas designaciones incluyen
25 progenie. Se entiende también que toda la progenie no puede

ser precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a las mutaciones deliberadas o inadvertidas. La progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la tamizada en la célula transformada originalmente también se
5 incluye. Será claro del contexto cuando se intenten designaciones diferentes.

"Tratamiento o tratar" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o hacer más
10 lenta (reducir) la afección o trastorno patológico seleccionado. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen quienes ya tienen el trastorno así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en quienes el trastorno vaya a prevenirse. Por consiguiente, el mamífero que será tratado en
15 la presente puede haber sido diagnosticado como teniendo el trastorno o puede estar predispuesto o ser susceptible al trastorno.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se
20 caracteriza típicamente por crecimiento celular desregulado o muerte. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no están limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia y malignidades linfoides. Ejemplos más particulares de estos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo,
25 cáncer epitelial de células escamosas), cáncer pulmonar

incluyendo cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer
 5 gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de seno, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal,
 10 cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma penil, así como cáncer de cabeza y cuello.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes
 15 quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquilsulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposufan; aziridinas tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina,
 20 trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorfosfamid, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina,
 25 prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas

tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, 5 carnomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcellomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, 10 puromicina, quetamicina, rodorrubicina, estroptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; 15 análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesociuridina, doxifluiridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de 20 dromostanolona, epitiostanol, mepitiostanol, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reactivador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; 25 edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina;

acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; motoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatin; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida;

5 procarbazona; PSK®; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2''-triclortrietilamina; uretano, vindesina; dacarbazina; manomustina; motobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel

10 (TAXOL®, Bristol Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.) y docetaxel (TAXOTERE®, Aventis, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido

15 (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; motoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o

20 derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas en tumores tales como anti-estrógenos incluyendo por ejemplo tamoxifen, raloxifen, 4(5)-imidazoles

25 inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifen, trioxifen,

queoxifen, LY117018, onapristona y toremifen (Fareston); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los
5 anteriores.

"Mamífero" para los propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo humanos, ratones, SCID o ratones desnudos o cepas de ratones, animales domésticos y de granja y animales de
10 zoológico, deportivos o de compañía tales como borregos, perros, caballos, gatos, vacas, etc. De preferencia, el mamífero en la presente es humano.

Los "oligonucleótidos" son polidesoxinucleótidos de cadena larga, de una sola o doble hebra que son sintetizados
15 químicamente mediante métodos conocidos (tales como química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita, incluyendo técnicas en fase sólida tales como las descritas en EP 266,032, publicada el 4 de mayo de 1988, o por medio de intermediarios de H-fosfonato de desoxinucleósido como los
20 descritos por Froehler et al., *Nucl. Acids. Res.*, 14:5399-5407, 1986. Son después purificados en geles de poliacrilamida.

De acuerdo con la presente invención, las formas "humanizada" y/o "quimérica" de inmunoglobulinas no humanas
25 (por ejemplo, murinas) se refieren a anticuerpos que

contienen inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina y fragmentos de los mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígenos de anticuerpo) lo cual da como resultado la reducción de un anticuerpo anti-ratón humano (HAMA), anticuerpo anti-quimérico humano (HACA) o una respuesta de anticuerpo anti-humano humano (HABA), en comparación con el anticuerpo original, y contienen las porciones necesarias (por ejemplo, CDRs, regiones de unión a antígeno, dominios variables y así sucesivamente) derivadas de la inmunoglobulina no humana, necesarias para reproducir el efecto deseado, mientras conservan simultáneamente características de unión que son comparables con las de la inmunoglobulina no humana. Por la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los cuales los residuos de las regiones de determinación de complementariedad (CDRs) del anticuerpo receptor son reemplazados por residuos de las CDRs en una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de la región estructural Fv (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazadas por residuos FR no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o FR importadas. Estas modificaciones se hacen

para refinar y optimizar más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente
5 todas las regiones CDR corresponden a aquellos de inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los residuos FR son aquellos de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región
10 constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos "des-inmunizados" son inmunoglobulinas que son no inmunógenas, o menos inmunógenas, para una especie dada. La des-inmunización puede lograrse a
15 través de alteraciones estructurales al anticuerpo. Cualquier técnica de des-inmunización conocida por aquellos expertos en la técnica puede emplearse. Una técnica adecuada para des-inmunizar anticuerpos se describe, por ejemplo, en WO
00/34317 publicada el 15 de junio de 2000.

20 Un anticuerpo que induce "apoptosis" es uno que induce muerte celular programada mediante cualquier medio, ilustrado pero no limitado a unión de anexina V, actividad caspasa, fragmentación de ADN, encogimiento celular, dilatación de retículo endoplásmico, fragmentación celular
25 y/o formación de vesículas de membrana (llamadas cuerpos

apoptósicos).

Según se usa en la presente "citotoxicidad inducida por anticuerpo" se entiende que significa el efecto citotóxico derivado del sobrenadante de hibridoma o anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01, un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01, un anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01, fragmentos de unión a antígeno o ligandos de anticuerpo de los mismos, efecto que no necesariamente está relacionado con el grado de unión.

A lo largo de la presente descripción, líneas de células de hibridoma, así como los anticuerpos monoclonales aislados que se producen de las mismas, se refieren alternativamente por su designación interna, AR40A746.2.3 o Designación del Depositario, IDAC 141204-01.

Según se usa en la presente "anticuerpo-ligando" incluye una porción que exhibe especificidad de unión para al menos un epítipo del antígeno objetivo, y la cual puede tener una molécula de anticuerpo intacta, fragmentos de anticuerpo y cualquier molécula que tenga al menos una región de unión a antígeno o porción de la misma (es decir, la porción variable de una molécula de anticuerpo), por ejemplo, una molécula Fv,

molécula Fab, molécula Fab', molécula F(ab')₂, un anticuerpo
bienespecífico, una proteína de fusión o cualquier molécula
genéticamente manipulada que reconozca y se una
específicamente al menos a un epítipo del antígeno unido por
5 el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de
células de hibridoma designada como IDAC 141204-01 (el
antígeno IDAC 141204-01), un anticuerpo humanizado del
anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma
depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01, un
10 anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado
producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el
número de registro 141204-01 y fragmentos de unión a
antígeno.

Según se usa en la presente "anticuerpos
15 modificadores de enfermedades cancerosas" (CDMAB) se refiere
a anticuerpos monoclonales que modifican el proceso de
enfermedad cancerosa de una manera que sea benéfica para el
paciente, por ejemplo al reducir carga tumoral o prolongar
supervivencia de individuos portadores de tumor, y
20 anticuerpos-ligandos de los mismos.

Un "agente de unión relacionado con CDMAB", en su
sentido más amplio, se entiende que incluye, pero no está
limitado a, cualquier forma de anticuerpos humanos o no
humanos, fragmentos de anticuerpo, ligandos de anticuerpo o
25 similares, que se unan competitivamente a por lo menos un

epítopo objetivo CDMAB.

Un "aglutinante competitivo" se entiende que incluye cualquier forma de anticuerpos humanos o no humanos, fragmentos de anticuerpo, ligandos de anticuerpo o similares
5 que tienen la afinidad de unión para al menos un epítopo objetivo de CDMAB.

Los tumores que se tratarán incluyen tumores primarios y tumores metastásicos, así como tumores refractarios. Los tumores refractarios incluyen tumores que
10 no responden o son resistentes a tratamiento con agentes quimioterapéuticos solos, anticuerpos solos, radiación sola o combinaciones de los mismos. Los tumores refractarios abarcan también tumores que parecen ser divididos por el tratamiento con estos agentes pero que recurren hasta cinco años, algunas
15 veces hasta diez años o más después de que se descontinúa el tratamiento.

Los tumores que pueden ser tratados incluyen tumores que no son vascularizados, o que aún no son sustancialmente vascularizados, así como tumores
20 vascularizados. Ejemplos de tumores sólidos, los cuales pueden tratarse en consecuencia, incluyen carcinoma de seno, carcinoma pulmonar, carcinoma colorrectal, carcinoma pancreático, glioma y linfoma. Algunos ejemplos de estos tumores incluyen tumores epidermoides, tumores escamosos,
25 tales como tumores de cabeza y cuello, tumores colorrectales,

tumores de próstata, tumores de seno, tumores de pulmón, incluyendo tumores de pulmón no microcíticos o microcíticos, tumores pancreáticos, tumores de tiroides, tumores ováricos y tumores hepáticos. Otros ejemplos incluyen sarcoma de Kaposi, 5 neoplasmas del SNC, neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metastasis cerebrales, melanoma, carcinomas gastrointestinales y renales y sarcomas, rabdomiosarcoma, glioblastoma, de preferencia glioblastoma multiforme, y leiomiosarcoma.

10 Según se usa en la presente "región de unión a antígeno" significa una porción de la molécula que reconoce el antígeno objetivo.

Según se usa en la presente "inhibe competitivamente" significa que es capaz de reconocer y 15 unirse a un sitio determinante al cual el anticuerpo monoclonal producido por la línea de células de hibridoma designada como IDAC 141204-01 (el anticuerpo IDAC 141204-01), un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el 20 número de registro 141204-01, un anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01, fragmentos de unión a antígeno o ligandos de anticuerpo de los mismos, se dirige usando ensayos de competencia de 25 anticuerpos recíprocos convencionales. (Belanger L.,

Sylvestre C. y Dufour D. (1973), Enzyme Linked immunoassay for alpha fetoprotein by competitive and sandwich procedures, Clinica Chimica Acta 48, 15).

Según se usa en la presente "antígeno objetivo" es
5 el antígeno IDAC 141204-01 o porciones del mismo.

Según se usa en la presente, un "inmunoconjugado" significa cualquier molécula o CDMAB tal como un anticuerpo enlazado química o biológicamente a citotoxinas, agentes radioactivos, citocinas, interferones, porciones objetivo
10 reporteras, enzimas, toxinas, fármacos antitumor o agentes terapéuticos. El anticuerpo o CDMAB puede ser enlazado a la citotoxina, agente radioactivo, citosina, interferón, porción objetivo reportera, enzima, toxina, fármaco antitumor o agente terapéutico en cualquier lugar a lo largo de la
15 molécula siempre y cuando sea capaz de unirse a su objetivo. Ejemplos inmunoconjugados incluyen conjugados químicos anticuerpos-toxina y proteínas de fusión anticuerpo-toxina.

Los agentes radioactivos adecuados para usarse como agentes antitumor se conocen por aquellos expertos en la
20 técnica. Por ejemplo, se usa ^{131}I o ^{211}At . Estos isótopos son unidos al anticuerpo usando técnicas convencionales (por ejemplo, Pedley et al., Br. J. Cancer 68, 69.73 /1993)). Como alternativa, el agente antitumor que se une al anticuerpo es una enzima que activa un profármaco. Un profármaco puede
25 administrarse el cual permanezca en su forma inactiva hasta

que alcance el sitio de tumor en donde se convierta en su forma de citotoxina una vez que el complejo de anticuerpo se administre. En la práctica, el conjugado anticuerpo-enzima se administra al paciente y se le deja ubicarse en la región del

5 tejido que será tratado. El profármaco es luego administrado al paciente de tal manera que la conversión en el fármaco citotóxico ocurra en la región del tejido que será tratado. Como alternativa, el agente antitumor conjugado al anticuerpo es una citosina tal como interleucina-2 (IL2), interleucina-4

10 (IL-4) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). El anticuerpo se dirige la citosina al tumor de tal forma que la citosina medie daño o destrucción del tumor sin afectar otros tejidos. La citosina es fusionada al anticuerpo a nivel de ADN usando técnicas de ADN recombinante convencionales.

15 También se pueden usar interferones.

Según se usa en la presente, una "proteína de fusión" significa cualquier proteína quimérica en la que se conecta una región de unión a antígeno a una molécula biológicamente activa, por ejemplo, toxina, enzima, proteínas

20 fluorescentes, marcador luminiscente, marcador polipéptido, citocina, interferón, porción objetivo o reportera o fármaco de proteínas.

La invención contempla además CDMAB de la presente invención al cual se enlazan porciones objetivo o reporteras.

25 Las porciones objetivo son los primeros miembros de pares de

unión. Los agentes antitumor, por ejemplo, son conjugados a segundos miembros de estos pares y son de esta manera dirigidos al sitio en donde la proteína de unión a antígeno es unida. Un ejemplo común de este par de unión es avidina y biotina. En una modalidad preferida, biotina se conjuga al antígeno objetivo del CDMAB de la presente invención, y de esta manera proporciona un objetivo para un agente antitumor u otra porción que sea conjugada a avidina o estreptavidina. Como alternativa, biotina u otra de estas porciones es enlazada al antígeno objetivo del CDMAB de la presente invención y usada como un reportero, por ejemplo en un sistema de diagnóstico en donde un agente productor de señal detectable se conjuga a avidina o estreptavidina.

Los agentes productores de señal detectable son útiles *in vivo* e *in vitro* para propósitos de diagnóstico. El agente productor de señal produce una señal medible que puede detectarse por medios externos, normalmente en la medición de radiación electromagnética. En la mayor parte, el agente productor de señal es una enzima o cromóforo, o emite luz por fluorescencia, fosforescencia o quimioluminiscencia. Los cromóforos incluyen colorantes que absorben luz en la región ultravioleta o visible, y pueden ser substratos o productos de degradación de reacciones catalizadas por enzimas.

Además, dentro del alcance de la presente invención

se incluye el uso de presente CDMAB *in vivo* y *in vitro* para métodos de investigación a diagnóstico, los cuales se conocen bien en la técnica. Para llevar a cabo los métodos de diagnóstico contemplados en la presente, la presente
5 invención puede incluir además kits, los cuales contengan CDMAB de la presente invención. Estos kits serán útiles para la identificación de individuos en riesgo de cierto tipo de cánceres al detectar la sobre-expresión del antígeno objetivo del CDMAB sobre células de estos individuos.

10 Kits para ensayos de diagnóstico

Se contempla utilizar el CDMAB de la presente invención en forma de un kit para ensayos de diagnóstico para determinar la presencia de un tumor. El tumor generalmente será detectado en un paciente con base en la presencia de uno
15 o más antígenos específicos de tumor, por ejemplo proteínas y/o polinucleótidos que codifiquen para estas proteínas en una muestra biológica, tal como sangre, suero, orina y/o biopsias de tumor, muestras que habrán sido obtenidas del paciente.

20 Las proteínas funcionan como marcadores que indican la presencia o ausencia de un tumor particular, por ejemplo un tumor de colon, seno, pulmón o próstata. Se contempla además que el antígeno tendrá utilidad para la detección de otros tumores cancerosos. La inclusión en los kits para
25 ensayos de diagnóstico de agentes de unión comprendidos de

MP

CDMAB de la presente invención, o agentes de unión relacionados con CDMAB, hace posible la detección del nivel de antígeno que se une al agente en la muestra biológica. Cebadores y sondas de polinucleótidos pueden usarse para

5 detectar el nivel de ARNm que codifique para una proteína de tumor, lo cual también es indicador de la presencia o ausencia de un cáncer. Para que el ensayo de unión sea diagnóstico, se habrán generado datos que correlacionen

10 niveles estadísticamente significativos de antígeno, en relación con aquéllos presentes en tejido normal, para de esta manera hacer el reconocimiento de unión definitivamente diagnóstico para la presencia de un tumor canceroso. Se contempla que una pluralidad de formatos será útil para el ensayo y diagnóstico de la presente invención, como se conoce

15 por aquellos de capacidad ordinaria en la técnica, usando un agente de unión para detectar marcadores polipéptidos en una muestra. Por ejemplo, como se ilustra en Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Se contemplan además cualquiera y todas las

20 combinaciones, permutaciones o modificaciones de los formatos de ensayo y diagnóstico descritos arriba.

La presencia o ausencia de un cáncer en un paciente será determinada típicamente al (a) poner en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente con un agente de

25 unión; (b) detectar en la muestra un nivel de polipéptido que

mm

se una al agente de unión y (c) comparar el nivel de polipéptidos con un valor límite predeterminado.

- En una modalidad ilustrativa, se contempla que el ensayo incluirá el uso de un CDMAB y un agente de unión a
- 5 base de CDMAB inmovilizado sobre un soporte sólido para unirse a y remover el polipéptido del resto de la muestra. El polipéptido unido puede ser después detectado usando un reactivo de detección que contenga un grupo reportero y se una específicamente al complejo agente de unión/polipéptido.
- 10 Los reactivos de detección ilustrativos pueden incluir un agente de unión a base de CDMAB que se una específicamente al polipéptido o un anticuerpo u otro agente que se una específicamente al agente de unión, tal como una anti-inmunoglobulina, proteína g, proteína A o una lectinas. En
- 15 una modalidad alternativa se contempla que se puede utilizar un ensayo competitivo en el cual un polipéptido sea marcado con un grupo reportero y se le deje unirse al agente de unión inmovilizado después de la incubación del agente de unión con la muestra. Indicador de la reactividad de la muestra con el
- 20 agente de unión inmovilizado, es el grado al cual los componentes de la muestra inhiben la unión del polipéptido marcado al agente de unión. Los polipéptidos adecuados para usarse dentro de estos ensayos incluyen proteínas específicas de tumor de longitud completa y/o porciones de las mismas, a
- 25 las cuales tiene afinidad el agente de unión.

El kit de diagnóstico será provisto con un soporte sólido que puede estar en forma de cualquier material por aquellos de capacidad ordinaria en la técnica a la cual puede fijarse la proteína. Ejemplos adecuados pueden incluir un pocillo de prueba en una placa de microtitulación o una membrana de nitrocelulosa u otra membrana adecuada. Como alternativa, el soporte puede ser una esfera o disco tal como un material de vidrio, fibra de vidrio, látex o plástico tal como poliestireno o cloruro de polivinilo. El soporte también puede ser una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, tal como aquellos descritos, por ejemplo, en patente de E.U.A. No. 5,539,681.

Se contempla que el agente de unión será inmovilizado sobre el soporte sólido usando una variedad de técnicas conocidas por aquellos de capacidad en la técnica, los cuales se describen ampliamente en la literatura de patente y científica. El término "inmovilización" se refiere tanto a asociación no covalente, tal como adsorción como a fijación covalente, la cual, en el contexto de la presente invención, puede ser un enlace directo entre el agente y grupos funcionales sobre el soporte, o puede ser un enlace por medio de un agente de reticulación. En una modalidad preferida aunque no limitativa, se prefiere la inmovilización por adsorción a un pocillo en una placa de microtitulación o a una membrana. La adsorción puede lograrse al poner en

contacto el agente de unión, en un regulador de pH adecuado, con el soporte sólido durante una cantidad de tiempo adecuada. El tiempo de contacto puede variar con temperatura, y generalmente estará dentro de una escala de entre alrededor
5 de 1 hora y aproximadamente 1 día.

La fijación covalente del agente de unión al soporte sólido normalmente se logrará al hacer reaccionar primero el soporte con un reactivo bifuncional que reaccionará tanto con el soporte como con un grupo funcional,
10 tal como un grupo hidroxilo o amino, en el agente de unión. Por ejemplo, el agente de unión puede fijarse covalentemente a soportes que tengan un recubrimiento polimérico adecuado usando benzoquinona o mediante condensación de un grupo aldehído sobre el soporte con una amina y un hidrógeno activo
15 en el socio de unión (véase, por ejemplo, Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, en A12 A13).

Se contempla además que el kit para ensayos de diagnóstico tendrá la forma de un ensayo de emparedado de dos anticuerpos. Este ensayo se puede llevar a cabo al poner en
20 contacto primero un anticuerpo, por ejemplo, el CDMAB actualmente descrito que haya sido inmovilizado sobre un soporte sólido, comúnmente el pocillo de una placa de microtitulación, con la muestra, de tal forma que a los polipéptidos dentro de la muestra se les deje unirse al
25 anticuerpo inmovilizado. La muestra no unida se remueve

después de los complejos polipéptido-anticuerpo inmovilizados y se añade un reactivo de detección (de preferencia un segundo anticuerpo capaz de unirse a un sitio diferente en el polipéptido) que contiene un grupo reportero. La cantidad de
5 reactivo de detección que permanece unida al soporte sólido se determina después usando un método adecuado para el grupo reportero específico.

En una modalidad específica, se contempla que una vez que el anticuerpo sea inmovilizado sobre el soporte como
10 se describió arriba, los sitios de unión a proteína restantes en el soporte serán bloqueados, mediante el uso de cualquier agente de bloqueo adecuado conocidos por aquellos de capacidad ordinaria en la técnica, tal como albúmina de suero bovino o Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). El
15 anticuerpo inmovilizado sería después incubado con la muestra, y el polipéptido se dejaría unirse al anticuerpo. La muestra puede ser diluida con un diluyente adecuado, tal como solución salina de pH regulado con fosfato (PBS) antes de su incubación. En general, un tiempo de contacto adecuado (es
20 decir, tiempo de incubación) se seleccionaría para corresponder un periodo suficiente para detectar la presencia de polipéptido dentro de una muestra obtenida de un individuo con el tumor específicamente seleccionado. De preferencia, el tiempo de contacto es suficiente para lograr un nivel de
25 unión que es de al menos aproximadamente 95% de aquél logrado

a equilibrio entre polipéptido unido y no unido. Aquellos de capacidad ordinaria en la técnica reconocerán que el tiempo necesario para lograr el equilibrio puede determinarse fácilmente al ensayar el nivel de unión que ocurre durante un
5 periodo de tiempo.

Se contempla además que la muestra no unida sería después removida al lavar el soporte sólido con un regulador de pH adecuado. El segundo anticuerpo, el cual contiene un grupo reportero, sería entonces añadido al soporte sólido. La
10 incubación del reactivo de detección con el complejo anticuerpo-polipéptido inmovilizado sería entonces llevada a cabo durante una cantidad de tiempo suficiente como para detectar el polipéptido unido. Subsecuentemente, el reactivo de detección no unido sería entonces removido y el reactivo
15 de detección unido sería detectado usando el grupo reportero. El método empleado para detectar el grupo reportero es necesariamente específico para el tipo de grupo reportero seleccionado, por ejemplo para grupos radioactivos, los métodos de conteo por centelleo o autorradiográficos son
20 generalmente adecuados. Se pueden usar métodos espectroscópicos para detectar colorantes, grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. La biotina puede detectarse usando avidina, acoplada a un grupo reportero diferente (comúnmente un grupo radioactivo o fluorescente o
25 una enzima). Los grupos reporteros de enzimas pueden

detectarse generalmente mediante la adición de substrato (generalmente durante un periodo de tiempo específico), seguido por el análisis espectroscópico u otro de los productos de reacción.

- 5 Para utilizar el kit para ensayos de diagnóstico de la presente invención para determinar la presencia o ausencia de un cáncer, tal como cáncer de próstata, la señal detectada del grupo reportero que sigue unido al soporte sólido generalmente sería comparada con una señal que correspondiera
- 10 a un valor límite predeterminado. Por ejemplo, un valor límite ilustrativo para la detección de un cáncer puede ser la señal promedio media obtenida cuando el anticuerpo inmovilizado es incubado con muestras de pacientes sin el cáncer. En general, una muestra que genere una señal que sea
- 15 aproximadamente tres desviaciones estándares por arriba del valor límite predeterminado se consideraría positiva para el cáncer. En una modalidad alternativa, el valor límite puede determinarse usando una Curva Operadora Receptora, de acuerdo con el método de Sackett et al., Clinical Epidemiology. A
- 20 Basic Science for Clinical Medicine, Little Brown and Co., 1985, p. 106-7. En esta modalidad, el valor límite podría determinarse a partir de una gráfica de pares de índices verdaderos positivos (es decir, sensibilidad) e índices falsos positivos (especificidad del 100 por ciento) que
- 25 corresponden a cada valor límite posible para el resultado de

la prueba de diagnóstico. El valor límite en la gráfica que es el más cercano a la esquina izquierda superior (es decir, el valor que encierra el área más grande) es el valor límite más preciso, y una muestra que genere una señal que sea más

5 alta que el valor límite determinada mediante este método puede considerarse positiva. Como alternativa, el valor límite puede desplazarse a la izquierda a lo largo de la gráfica, para minimizar el índice falso positivo, o a la derecha, para minimizar el índice falso negativo. En general,

10 una muestra que genere una señal que sea más alta que el valor límite determinado por este método se considera positiva para un cáncer.

Se contempla que el ensayo de diagnóstico hecho posible por el kit se llevará a cabo ya sea en un formato de

15 paso de flujo o de tira de prueba, en donde el agente de unión es inmovilizado sobre una membrana, tal como nitrocelulosa. En la prueba de paso de flujo, los polipéptidos dentro de la muestra se unen al agente de unión inmovilizado al pasar la muestra a través de la membrana. Un

20 segundo agente de unión marcado se une después al polipéptido de agente de unión y al complejo de agente de unión-polipéptido como una solución que contiene el segundo agente de unión que fluye a través de la membrana. La detección del segundo agente de unión unido puede llevarse a cabo después

25 como se describió arriba. En el formato de tira de prueba, un

extremo de la membrana a la cual se une el agente de unión se sumergirá en una solución que contenga la muestra. La muestra migra a lo largo de la membrana a través de una región que contiene segundo agente de unión y al área de agente de unión

5 inmovilizado. La concentración del segundo agente de unión en el área de anticuerpo inmovilizado indica la presencia de un cáncer. La generación de un patrón, tal como una línea, en el sitio de unión, que puede verse visualmente, será indicadora de una prueba positiva. La ausencia de este patrón indica un

10 resultado negativo. En general, la cantidad de agente de unión inmovilizado sobre la membrana se selecciona para generar un patrón visualmente discernible cuando la muestra biológica contenga un nivel de polipéptido que sería insuficiente para generar una señal positiva en el ensayo de

15 emparejado de dos anticuerpos, en el formato descrito arriba. Los agentes de unión preferidos para usarse en el presente ensayo de diagnóstico son los anticuerpos actualmente descritos, fragmentos de unión a antígeno de los mismos y cualquier agente de unión relacionado con CDMAB como el

20 descrito en la presente. La cantidad de anticuerpo inmovilizado sobre la membrana será cualquier cantidad efectiva para producir el ensayo de diagnóstico, y cualquier escala de aproximadamente 25 nanogramos a alrededor de 1 microgramo. Típicamente estas pruebas pueden llevarse a cabo

25 con una cantidad muy pequeña de muestra biológica.

Además, el CDMAB de la presente invención puede usarse en el laboratorio para investigación gracias a su capacidad para identificar su antígeno objetivo.

Para que la invención descrita en la presente pueda entenderse más completamente, se muestra la siguiente descripción.

La presente invención proporciona CDMAB (es decir, IDAC 141204-01 CDMAB, un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01, un anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01, fragmentos de unión a antígeno o ligandos de anticuerpo de los mismos) que reconocen específicamente y se unen al antígeno IDAC 141204-01.

El CDMAB del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 puede estar en cualquier forma siempre y cuando tenga una región de unión a antígeno que inhiba competitivamente la unión inespecífica del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma IDAC 141204-01 a su antígeno objetivo. De esta manera, cualquier proteína recombinante (por ejemplo, proteínas de fusión en las que el anticuerpo se combine con una segunda proteína tal como una lincocina o un factor de crecimiento inhibidor de

tumor) que tenga la misma especificidad de unión que el anticuerpo IDAC 141204-01 está dentro del alcance de esta invención.

En una modalidad de la invención, el CDMAB es el
5 anticuerpo IDAC 141204-01.

En otras modalidades, el CDMAB es un fragmento de unión a antígeno que puede ser una molécula Fv (tal como una molécula Fv de cadena individual), una molécula Fab, una molécula Fab', una molécula F(ab')₂, una proteína de fusión,
10 un anticuerpo biespecífico, un heteroanticuerpo o cualquier molécula recombinante que tenga la región de unión a antígeno del anticuerpo IDAC 141204-01. El CDMAB de la invención está dirigido al epítipo al cual se dirige el anticuerpo monoclonal IDAC 141204-01.

15 El CDMAB de la invención puede modificarse, es decir, mediante modificaciones de aminoácido dentro de la molécula, para producir así moléculas derivadas. También puede ser posible la modificación química. La modificación por mutación directa, métodos de maduración por afinidad,
20 despliegue de fagos o reclasificación de cadena también puede ser posible.

La afinidad y especificidad pueden modificarse o mejorarse al mutar residuos de CDR y/o de fenilalanina triptófano (FW) y tamizando para los sitios de unión a
25 antígeno que tengan las características deseadas (por

ejemplo, Yang et al., J. Mol. Biol., (1995) 254:392-403). Una forma es la de aleatorizar residuos o combinaciones de residuos individuales de tal manera que en una población de sitios de unión a antígeno de otra manera idénticos, subconjuntos de dos a veinte aminoácidos se encuentren en posiciones particulares. Como alternativa, las mutaciones pueden ser inducidas sobre una gama de residuos mediante métodos de PCR propensos a error (por ejemplo, Hawkins et al., J. Mol. Biol. (1992) 226:889-96). En otro ejemplo, vectores de despliegue de fagos que contengan genes de la región variable de la cadena pesada y ligera pueden propagarse en cepas mutantes de *E. coli* (por ejemplo, Low et al, J Mol. Biol., (1996) 250:359-68). Estos métodos de mutagénesis son ilustrativos de los muchos métodos conocidos por alguien de capacidad en la técnica.

Otra manera de incrementar la afinidad de los anticuerpos de la presente invención es la de llevar a cabo depuración de cadena, en donde las cadenas pesada o ligera son apareadas aleatoriamente con otras cadenas pesadas o ligeras para preparar un anticuerpo con afinidad más alta. Las diferentes CDRs de los anticuerpos también pueden ser depuradas con las CDRs correspondientes en otros anticuerpos.

Las moléculas derivadas pueden conservar la propiedad funcional del polipéptido, en particular, la molécula que tenga estas sustituciones permitirá aún la unión

del polipéptido al antígeno IDAC 141204-01 o porciones del mismo.

Estas sustituciones de aminoácido incluyen, pero no necesariamente están limitadas a, sustituciones de aminoácido
5 conocidas en la técnica como "conservadoras".

Por ejemplo, un principio bien establecido de química de proteínas es que ciertas sustituciones de aminoácido, tituladas "sustituciones de aminoácido conservadoras", frecuentemente pueden hacerse en una proteína
10 sin alterar ya sea la conformación o la función de la proteína.

Estos cambios incluyen sustituir cualquiera de isoleucina (I), valina (V) y leucina (L) por cualquiera otros de estos aminoácidos hidrófobos; ácido aspártico (D) por
15 ácido glutámico (E) y viceversa; glutamina (Q) para asparagina (N) y viceversa y serina (S) por treonina (T) y viceversa. Otras sustituciones también pueden considerarse conservadoras, dependiendo del ambiente del aminoácido particular y su papel en la estructura tridimensional de la
20 proteína. Por ejemplo, glicina (G) y alanina (A) frecuentemente pueden ser intercambiables, al igual que alanina y valina (V). Metionina (M), la cual es relativamente hidrófoba, frecuentemente puede intercambiarse con leucina e isoleucina, y algunas veces con valina. Lisina (K) y arginina
25 (R) frecuentemente son intercambiables en ubicaciones en las

cuales la característica significativa del residuo de aminoácido es su carga y los pKs diferentes de estos dos residuos de aminoácido no son significativos. Otros cambios más pueden considerarse "conservadores" en ambientes
5 particulares.

Ejemplo 1

Producción de hibridoma - Línea de células de hibridoma

AR40A746.2.3

10 La línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 se depositó, de acuerdo con el tratado de Budapest, ante la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá (IDAC), Bureau of Microbiology, Health Canada, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, Canadá, R3E 3R2, el 14 de diciembre de
15 2004, con el número de registro 141204-01. De acuerdo con 37 CFR 1.808, los depositantes aseguran que todas las restricciones impuestas en la disponibilidad al público de los materiales depositados serán retiradas irrevocablemente después de la concesión de la patente. El depósito será
20 reemplazado si el depositario no puede ofrecer muestras viables.

Para producir el hibridoma que produzca el anticuerpo anticáncer AR40A746.2.3, una sola suspensión celular de tejido de tumor de adenocarcinoma de próstata
25 congelado (Genomics Collaborative, Cambridge, MA) se preparó

en PBS. El adyuvante IMMUNEASY™ (Qiagen, Venlo, Netherlands) se preparó para usarse por mezcla suave. Ratones BALB/c de cinco a siete semanas fueron inmunizados al inyectar subcutáneamente 2 millones de células en 50 microlitros del
5 antígeno-adyuvante. Antígeno-adyuvante recién preparado se usó para reforzar los ratones inmunizados intraperitonealmente, dos y tres semanas después de la inmunización inicial, con 2 millones de células en 50 microlitros. Se usó un bazo para fusión de tres días después
10 de la última inmunización. Los hibridomas se prepararon al fusionar los esplenocitos aislados con socios de mieloma NSO-1. Los sobrenadantes de las fusiones se probaron a partir de subclones de los hibridomas.

Para determinar si los anticuerpos secretados por
15 las células de hibridoma son del isotipo IgG o IgM, se emplea un ensayo ELISA. 100 microlitros/pocillo de anti-ratón IgG + IgM (H+L) de cabra bajo una concentración de 2.4 microgramos/mL en regulador de pH de recubrimiento (regulador de pH de carbonato/bicarbonato 0.1 M, pH 9.2-9.6) a 4°C se
20 añadió a las placas de ELISA durante la noche. Las placas se lavaron tres veces en regulador de pH de lavado (PBS + 0.05% de Tween). 100 microlitros/pocillo de regulador de pH de bloqueo (5% de leche en regulador de pH de lavado) se añadieron a la placa durante 1 hora a temperatura ambiente y
25 después se lavaron tres veces en regulador de pH de lavado.

Se añadieron 100 microlitros/pocillo de sobrenadante de hibridoma y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con regulador de pH de lavado y una dilución 1/100,000 ya sea de conjugado de IgG o IgM de anti-ratón de cabra de peroxidasa de rábano (diluido en PBS que contenía 1% de leche), 100 microlitros/pocillo, fueron añadidos. Después de incubar la placa durante 1 hora a temperatura ambiente la placa se lavó 3 veces con regulador de pH de lavado. Se incubaron 100 microlitros/pocillo de solución TMB durante 3 minutos a temperatura ambiente. La reacción de color se terminó al añadir 50 microlitros/pocillo de H_2SO_4 2M y la placa se leyó a 450 nm con un lector de placa Perkin-Elmer HTS7000. Como se indica en la figura 1, el hibridoma AR40A746.2.3 secretó principalmente anticuerpos del isotipo IgG.

Para determinar la subclase de anticuerpo secretada por las células de hibridoma, se llevó a cabo un experimento de isotipificación usando un Equipo de Isotipificación de Anticuerpos Monoclonales de Ratón (HyCult Biotechnology, Frontstraat, Los Países Bajos). Se añadieron 500 microlitros de solución reguladora de pH a la tira de prueba que contenía anticuerpos específicos de subclase anti-ratón de rata. Se añadieron 500 microlitros de sobrenadante de hibridoma a tubo de ensayo, y se sumergieron mediante agitación suave. Las inmunoglobulinas de ratón capturadas se detectaron

directamente por un segundo anticuerpo monoclonal de rata que es acoplado a partículas coloides. La combinación de estas dos proteínas crea una señal visual usada para analizar el isotipo. El anticuerpo anticáncer AR40A746.2.3 es del isotipo
5 kappa de IgG1.

Después de una ronda de dilución limitante, sobrenadantes de hibridoma se probaron para anticuerpos que se unieron a células objetivo en un ensayo de ELISA celular. Dos líneas de células de cáncer de próstata humano y 1 línea
10 de células de piel no cancerosas humanas fueron probadas: PC-3, LnCap y CCD-27sk respectivamente. Todas las líneas de células se obtuvieron de la Colección Americana de Equipos de Tejidos (ATCC, Manassas, VA). Las células plaqueadas fueron fijadas antes de usar. Las placas se lavaron tres veces con
15 PBS que contenía $MgCl_2$ y $CaCl_2$ a temperatura ambiente. Se añadieron 100 microlitros paraformaldehído al 2% diluido en PBS a cada pocillo durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se descartaron. Las placas se lavaron de nuevo con PBS que contenía $MgCl_2$ y $CaCl_2$ tres veces a temperatura
20 ambiente. El bloqueo se llevó a cabo con 100 microlitros/pocillo de 5% de leche en regulador de pH de lavado (PBS + 0.05% de Tween) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con regulador de pH de lavado y el sobrenadante de hibridomas se añadió a 100
25 microlitros/pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron 3 veces con regulador de pH de lavado y se añadieron 100 microlitros/pocillo de una dilución 1/25,000 de anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado a peroxidasa de rábano (diluido en PBS que contenía 1% de leche). Después
5 de una hora de incubación a temperatura ambiente las placas fueron lavadas 3 veces con regulador de pH de lavado y 100 microlitros/pocillo de substrato TMB se incubaron durante 1-3 minutos a temperatura ambiente. La reacción se concluyó con 100 microlitros/pocillo de H_2SO_4 2M y la placa se leyó a 450
10 nm con un lector de placa Perkin-Elmer HTS7000. Los resultados tabulados en la figura 1 se expresaron como el número de veces sobre el fondo en comparación con un control de isotipo de IgG en casa que había mostrado previamente no unirse a las líneas de células probadas. Los anticuerpos para
15 el hibridoma AR40A746.2.3 mostraron unión a las líneas de células cancerosas de próstata PC-3 y LnCap sin unión detectable a la línea de células dérmicas no cancerosas CCD-27sk.

En conjunto con pruebas para unión a anticuerpos,
20 el efecto citotóxico de los sobrenadantes de hibridomas (citotoxicidad inducida por anticuerpos) se probó en las líneas de células: PC-3, LnCap y CCD-27sk. Calceína AM se obtuvo de Molecular Probes (Eugene, OR) y el ensayo se llevó a cabo como se detalla abajo. Las células fueron plaqueadas
25 antes del ensayo a la densidad adecuada predeterminada.

Después de dos días, 100 microlitros de sobrenadante de las placas de microtitulación de hibridoma se transfirieron a las placas de células y se incubaron en una incubadora de CO₂ al 5% durante 5 días. Los pocillos que sirvieron como los
5 controles positivos fueron aspirados hasta que fueran vaciados y 100 microlitros de azida de sodio (NaN₃, .01%, Sigma, Oakville, ON) o cicloheximida (CHX, 0.5 micromolar, Sigma, Oakville, ON) disueltos en medio de cultivo, fueron añadidos. Después de 5 días de tratamiento, las placas fueron
10 vaciadas entonces en invertirlas y secarlas por golpeteo. DPBS a temperatura ambiente (solución salina de pH regulado con fosfato de Dulbecco) que contenía MgCl₂ y CaCl₂ se colocó en cada pocillo de una botella de opresión de canales múltiples, se inclinó 3 veces, se vació mediante inversión y
15 luego se secó por golpeteo. 50 microlitros del colorante de calceína fluorescente diluido en DPBS que contenía MgCl₂ y CaCl₂ se añadieron a cada pocillo y se incubaron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% durante 30 minutos. Las placas se leyeron en un lector de placa de fluorescencia Perkin-Elmer
20 HTS7000 y los datos se analizaron en Microsoft Excel. Los resultados se tabulan en la figura 1. Sobrenadante del hibridoma AR40A746.2.3 produjo citotoxicidad específica de 8% en las células cancerosas de próstata LnCap. Esto fue 12 y
25 14% de la citotoxicidad obtenida con los controles positivos azida de sodio y cicloheximida en las células de cáncer de

próstata LnCap, respectivamente.

Resultados de la figura 1 demuestran que los efectos citotóxicos de AR40A746.2.3 se correlacionan con los niveles de unión de los tipos de células cancerosas. La unión detectable más fuerte fue a las células de cáncer de próstata LnCap y similarmente la citotoxicidad más alta detectable fue también en las células de cáncer de próstata LnCap. Como se tabula en la figura 1, AR40A746.2.3 no produjo citotoxicidad en la línea de células dérmicas humanas no cancerosas CCD-27sk. Los agentes citotóxicos no específicos conocidos cicloheximida y NaN_3 produjeron generalmente citotoxicidad como se esperaba.

Ejemplo 2

Unión in vitro

Anticuerpo monoclonal AR40A746.2.3 se produjo al cultivar el hibridoma en matraces CL-1000 (BD Biosciences, Oakville, ON) con recolecciones y resiembra ocurriendo dos veces/semana. Los procedimientos de purificación de anticuerpos estándares con Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, QC) fueron seguidos. Está dentro del alcance de esta invención utilizar anticuerpo monoclonales que son desinmunizados, humanizados, quiméricos o murinos.

La unión de AR40A746.2.3 a líneas de células de

cáncer de colon (DLD-I, HT-29, Lovo y SW1116), páncreas (BxPC-3), seno (MDA-MB-231 y MCF-7), próstata (PC-3 and DU-145), ovario (OVCAR-3) y melanoma (A2058, A375, WM9, WM35, WM164, WM451, WM537, WM852, WM983, WM1205 y WM1232), y no
5 cancerosas de piel (CCD-27sk) y pulmón (Hs888.Lu) se evaluó mediante citometría de flujo (FACS). Todas las líneas celulares se obtuvieron de la Colección Americana de Tipos de Tejidos (ATCC, Manassas, VA) excepto las líneas de células de melanoma WM9, WM35, WM 164, WM451, WM537, WM852, WM983, WM
10 1205 y WM 1232 que se obtuvieron de Dr. David Hogg (University of Toronto, Toronto, Canadá).

Se prepararon células para FACS al lavar inicialmente la monocapa de células con DPBS (sin Ca^{++} y Mg^{++}). Regulador de pH de disociación de células (Invitrogen,
15 Burlington, ON) se usó después para desprender las células de sus placas de cultivo de células a 37°C . Después de centrifugación y colección, las células fueron resuspendidas en DPBS que contenía MgCl_2 , CaCl_2 y 2% de suero bovino fetal a 4°C (medio de tinción) y se juntaron, se alícuotas hasta
20 densidad celular adecuada, se centrifugaron para sedimentar las células y resuspender en medio de tinción a 4°C en presencia del anticuerpo de prueba (AR40A746.2.3) o anticuerpos de control (control de isotipo, anti-EGFR). El control de isotipo y anticuerpo de prueba se evaluaron a 20
25 microgramos/mL mientras que anti-EGFR se evaluó a 5

microgramos/mL en hielo durante 30 minutos. Antes de la adición de anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 546 las células fueron lavadas una vez con medio de tinción. El anticuerpo conjugado a Alexa Fluor 546 en medio de tinción se

5 añadió después durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron después durante el tiempo final y se resuspendieron en medio de fijación (medio de tinción que contenía 1.5% de paraformaldehído). La adquisición citométrica de flujo de las células se evaluó al ejecutar las muestras en un FACSarray™

10 usando el FACSarray™ System Software (BD Biosciences, Oakville, ON). La dispersión hacia adelante (FSC) y lateral (SSC) de las células se establecieron al ajustar las ganancias de voltaje y amplitud en los detectores FSC y SSC. Los detectores para el canal de fluorescencia (Alexa-546) se

15 ajustaron al ejecutar las células no teñidas de tal manera que las células tuvieran un pico uniforme con una intensidad de fluorescente media de aproximadamente 1-5 unidades. Para cada muestra, aproximadamente 10,000 eventos regulados (células fijas teñidas) se adquirieron para el análisis y los

20 resultados se presentan en la figura 2.

La figura 2 presenta el incremento en veces por intensidad de fluorescencia media sobre el control de isotipo. Histogramas representativos de anticuerpos AR40A746.2.3 fueron compilados para la figura 3. AR40A746.2.3

25 demostró fuerte unión a las líneas de células de cáncer de

colon DLD-I (50.5 veces), HT-29 (80.5 veces) y Lovo (31.6 veces), seno MCF-7 (107.4 veces), próstata PC-3 (37.8 veces) y DU-145 (30.4 veces) y ovario OVCAR-3 (64.9 veces). También hubo unión a líneas de células de cáncer humano de colon
 5 SW1116 (13.3 veces), páncreas BxPC-3 (18.4 veces), seno MDA-MB- 231 (19.8 veces) y melanoma A2058 (2.7 veces), A375 (4.7 veces), WM9 (4.8 veces), WM35 (13.8 veces), WM164 (3.3 veces), WM451 (7.0 veces), WM537 (2.6 veces), WM852 (4.2 veces), WM983 (3.9 veces) y WM 1232 (3.4 veces). Hubo una
 10 unión detectable a células de piel no cancerosas humanas CCD-27sk (8.7 veces) y pulmón Hs888.Lu (20.5 veces). Tampoco hubo unión detectable a la línea de células de cáncer de melanoma WM1205. Estos datos demuestran que AR40A746.2.3 se unió a varias líneas de células cancerosas diferentes con niveles
 15 variables de expresión de antígenos.

Ejemplo 3

Experimento de tumor in vivo con células de cáncer

pancreático BxPC-3 humano

20 En el ejemplo 1, AR40A746.2.3 demostró citotoxicidad contra células cancerosas humanas *in vitro*. Para extender este descubrimiento a un modelo *in vivo*, AR40A746.2.3 se probó en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático BxPC-3 humano. Con referencia a las figuras 4 y
 25 5, ratones SCID hembra de 8 a 10 semanas de edad fueron

implantados con 5 millones de células de cáncer pancreático humano (BxPC-3) en 100 microlitros de solución PBS inyectada subcutáneamente en el pescuezo. Los ratones fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos de tratamiento de 5. El día 5 después del implante, 20 mg/kg de anticuerpo de prueba AR40A746.2.3 o control regulador de pH se administraron intraperitonealmente a cada cohorte en un volumen de 300 microlitros después de una dilución a partir de la concentración de abastecimiento con un diluyente que contenía 10 2.7 mM de KCl, 1 mM de KH_2PO_4 , 137 mM de NaCl y 20 mM de Na_2HPO_4 . Las muestras de anticuerpo y de control fueron después administradas una vez por semana durante la duración del estudio. Se midió el crecimiento del tumor casi cada 7 días con calibres. El estudio se completó después de 8 dosis 15 de anticuerpo. Se registraron los pesos corporales de los animales una vez por semana durante la duración del estudio. Al final de estudio todos los animales fueron sometidos a eutanasia de acuerdo con los lineamientos de la CCAC.

AR40A746.2.3 redujo el crecimiento de tumor en el 20 modelo profiláctico *in vivo* BxPC-3 de cáncer pancreático humano. El tratamiento con el anticuerpo Arius AR40A746.2.3 redujo significativamente el crecimiento de tumores BxPC-3 en 99.56 por ciento ($p < 0.0001$, prueba t), en comparación con el grupo tratado con regulador de pH, según se determinó el día 25 55, 5 días después de la última dosis del anticuerpo (figura

4).

No hubo señales clínicas de toxicidad a lo largo del estudio. El peso corporal medido a intervalos semanales fue un sustituto para bienestar e incapacidad de desarrollo.

5 El peso corporal medio se incrementó en todos los grupos durante la duración del estudio (figura 5). La ganancia de peso media entre el día 0 y día 55 fue de 2.8 g (9.9 por ciento) en el grupo de control y 3.0 g (15.3 por ciento) en el grupo tratado con AR40A746.2.3. No hubo diferencias
10 significativas entre los grupos al final del periodo de tratamiento.

En resumen, AR40A746.2.3 fue bien tolerado y redujo la carga tumoral en este modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano.

15

Ejemplo 4

Experimento de tumor in vivo con células de cáncer pancreático BxPC-3 humano

En el ejemplo 3, AR40A746.2.3 demostró eficacia
20 contra modelo de cáncer de xenoinjerto pancreático profiláctico humano. Para extender este descubrimiento a un modelo establecido, AR40A746.2.3 se probó en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático BxPC-3 humano establecido. Con referencia a las figuras 6 y 7, ratones SCID hembra de 8
25 a 10 semanas de edad fueron implantados con 5 millones de

células de cáncer pancreático humano (BxPC-3) en 100 microlitros de solución PBS inyectada subcutáneamente en el pescuezo de cada ratón. Los ratones fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos de tratamiento de 8 cuando el
5 volumen de tumor de ratón promedio alcanzó aproximadamente 83 mm³. El día 31 después de la implantación, 20 mg/kg de anticuerpo de prueba AR40A746.2.3 o control regulador de pH se administraron intraperitonealmente a cada cohorte en un volumen de 300 microlitros después de una dilución a partir
10 de la concentración de abastecimiento con un diluyente que contenía 2.7 mM de KCl, 1 mM de KH₂PO₄, 137 mM de NaCl y 20 mM de Na₂HPO₄. Las muestras de anticuerpo y de control fueron después administradas tres veces a la semana durante alrededor de tres semanas. Se midió el crecimiento del tumor
15 1 vez a la semana con calibres. El tratamiento se completó después de 10 dosis de anticuerpo. Se registraron los pesos corporales de los animales al mismo tiempo que la medición del tumor. Todos los animales fueron sometidos a eutanasia de acuerdo con los lineamientos de la CCAC al final de estudio
20 una vez que hubieron alcanzado el parámetro.

AR40A746.2.3 demostró inhibición significativamente de crecimiento de tumor en el modelo establecido *in vivo* BxPC-3 de cáncer pancreático humano. El tratamiento con anticuerpo Arius AR40A746.2.3 redujo el crecimiento de
25 tumores BxPC-3 en 70.14 por ciento ($p=0.00001$, prueba t), en

comparación con el grupo tratado con regulador de pH, según se determinó el día 58, 6 días después de la última dosis del anticuerpo (figura 6).

No hubo señales clínicas de toxicidad a lo largo del estudio. El peso corporal medido a intervalos semanales fue un sustituto para bienestar e incapacidad de desarrollo. El peso corporal medio permaneció casi igual en todos los grupos durante la duración del estudio (figura 7). No hubo diferencias significativas entre los grupos durante el periodo de tratamiento.

En resumen, AR40A746.2.3 fue bien tolerado e inhibió significativamente el crecimiento de tumor en modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano establecido.

15

Ejemplo 5

Experimento de tumor in vivo con células de cáncer de seno

MDA-MB-231 humano

En los ejemplos 3 y 4, AR40A746.2.3 demostró eficacia contra modelos de cáncer de xenoinjerto pancreático humano. Para extender este descubrimiento a un modelo de cáncer de seno, se probó AR40A746.2.3 en un modelo de xenoinjerto de cáncer de seno MDA-MB-31 humano establecido. Con referencia a las figuras 8 y 9, ratones SCID hembra de 8 a 10 semanas de edad, fueron implantados con 5 millones de células cancerosas de seno humano (MDA-MB-231) en 100

microlitros de solución PBS inyectados subcutáneamente en el pescuezo de cada ratón. Los ratones fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos de tratamiento de 10 cuando el volumen de tumor de ratón promedio alcanzó aproximadamente 5 100 mm³. El día 59 después de la implantación, 20 mg/kg de anticuerpo de prueba AR40A746.2.3 o control de regulador de pH se administraron intraperitonealmente a cada cohorte en un volumen de 300 microlitros después de dilución a partir de la concentración de abastecimiento con un diluyente que contenía 10 2.7 mM de KCl, 1 mM de KH₂PO₄, 137 mM de NaCl y 20 mM de Na₂HPO₄. Las muestras de anticuerpo y control fueron después administradas tres veces por semana durante alrededor de 3 semanas. Se midió el crecimiento del tumor una vez por semana con calibres. El tratamiento se completó después de 10 dosis 15 de anticuerpo. Los pesos corporales de los animales fueron registrados al mismo tiempo que las mediciones de tumor. Todos los animales fueron sometidos a eutanasia de acuerdo con los lineamientos del Consejo Canadiense sobre el Cuidado de Animales (CCAC) al final del estudio una vez que habían 20 alcanzado el parámetro.

AR40A746.2.3 demostró inhibición de crecimiento de tumor en el modelo establecido *in vivo* MDA-MB-231 de cáncer de seno humano. El tratamiento con anticuerpo ARIUS AR40A746.2.3 redujo el crecimiento de tumores MDA-MB-231 en 25 42.67 por ciento ($p < 0.08$, prueba t), en comparación con el

grupo tratado con regulador de pH, según se determinó el día 90, 10 días después de la última dosis de anticuerpo. (figura 8).

No hubo señales clínicas de toxicidad obvias a lo largo del estudio. El peso corporal medido a intervalos semanales fue un sustituto para bienestar e incapacidad de desarrollo. El peso corporal medio se incrementó en todos los grupos durante la duración del estudio (figura 9). La ganancia de peso promedio entre el día 59 y día 90 fue 1.64 g (7.0 por ciento) en el grupo de control y 0.17 g (0.8 por ciento) en el grupo tratado con AR40A746.2.3. No hubo diferencias significativas entre los grupos durante el periodo de tratamiento.

En resumen, AR40A746.2.3 fue bien tolerado e inhibió el crecimiento de tumor en este modelo de xenoinjerto de cáncer de seno humano. AR40A746.2.3 ha demostrado eficacia contra tres indicaciones de4 cáncer humano diferentes: próstata, pancreático y seno. Beneficios del tratamiento se observaron en varios modelos bien reconocidos de enfermedad de cáncer humana sugiriendo beneficios farmacológicos y farmacéuticos de este anticuerpo para terapia en otros mamíferos, incluyendo el hombre. En total, estos datos demuestran que el antígeno AR40A746.2.3 es un antígeno asociado a cáncer y es expresado en células de cáncer humano, y es un objetivo para cáncer patológicamente relevante.

Ejemplo 6**Experimento de tumor in vivo con células de cáncer
pancreático BxPC-3 humano**

En los ejemplos 3 y 4, AR40A746.2.3 demostró
5 eficacia en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático
humano BxPC-3 tanto profiláctico como establecido. Para
determinar los niveles de dosis efectivos, AR40A746.2.3 se
probó en un modelo BxPC-3 establecido a varias dosis. Con
referencia a las figuras 10 y 11, ratones SCID hembra de 8 a
10 10 semanas de edad, fueron implantados con 5 millones de
células de cáncer pancreático humano (BxPC-3) en 100
microlitros de solución PBS inyectada subcutáneamente en el
pescuezo de cada ratón. Los ratones fueron divididos
aleatoriamente en 5 grupos de tratamiento de 9 cuando el
15 volumen de tumor de ratón promedio alcanzó aproximadamente 83
mm³. El día 30 después de la implantación, 20, 10, 5 ó 2
mg/kg de anticuerpo de prueba AR40A746.2.3 o control de
regulador de pH se administraron intraperitonealmente a cada
cohorte en un volumen de 300 microlitros después de una
20 dilución a partir de la concentración de abastecimiento con
un diluyente que contenía 2.7 mM de KCl, 1 mM de KH₂PO₄, 137
mM de NaCl y 20 mM de Na₂HPO₄. Las muestras de anticuerpo y
control fueron después administradas tres veces por semana
durante alrededor de 3 semanas. Se midió el crecimiento del
25 tumor una vez cada semana con calibres. El tratamiento se

completó después de 10 dosis de anticuerpo. Los pesos corporales de los animales se registraron al mismo tiempo que la medición del tumor. Todos los animales fueron sometidos a eutanasia de acuerdo con los lineamientos de la CCAC al final
5 del estudio una vez que habían alcanzado el parámetro.

AR40A746.2.3 demostró inhibición dependiente de dosis de crecimiento de tumor en el modelo establecido *in vivo* de cáncer pancreático humano. El tratamiento con anticuerpo ARIUS AR40A746.2.3 a dosis de 20, 10, 5 ó 2 mg/kg
10 redujo el crecimiento de tumores BxPC-3 en 64.7 por ciento ($p < 0.0003$, prueba t), 69.9 por ciento ($p < 0.0001$, prueba t), 63.7 por ciento ($p < 0.0003$, prueba t) o 42.0 por ciento ($p < 0.0074$, prueba t), en comparación con el grupo tratado con regulador de pH, según se determinó el día 61, 10 días
15 después de la última dosis de anticuerpo (Figura 10). Inhibición máxima se obtuvo a las dosis de 20, 10 y 5 mg/kg.

No hubo señales clínicas de toxicidad obvias a lo largo del estudio. El peso corporal medido a intervalos semanales fue un sustituto para bienestar e incapacidad de
20 desarrollo. El peso corporal medio permaneció igual en todos los grupos durante la duración del estudio (figura 11). No hubo diferencias significativas entre los grupos durante el periodo de tratamiento.

En resumen, AR40A746.2.3 fue bien tolerado e
25 inhibió significativamente, a todas las dosis probadas, el

crecimiento de tumor de una manera dependiente de dosis en este modelo de xenoinjerto de cáncer de pancreático humano establecido. En total, estos datos demuestran que AR40A746.2.3 es efectivo en el tratamiento de cáncer humano

5 de una manera dependiente de dosis.

Ejemplo 7

Experimento de tumor in vivo con células de cáncer

pancreático BxPC-3 humanas

10 En los ejemplos 3, 4, 5 y 6, AR40A746.2.3 demostró eficacia como un anticuerpo entero. Para determinar si la eficacia podría mantenerse como un fragmento de anticuerpo, AR40A746.2.3 y $F(ab')_2$ de AR40A746.2.3 se probaron en un modelo de xenoinjerto pancreático BxPC-3 establecido.

15 AR40A746.2.3 se produjo y se purificó como se delinea en el ejemplo 2. AR40A746.2.3 purificado se cortó subsecuentemente por digestión con pepsina y/o ficina para producir la molécula $F(ab')_2$. La separación de los fragmentos se llevó a cabo usando unidades centrífugas Amicon de exclusión de

20 tamaño (50,000 kDa de límite de peso molecular) y/o cromatografía de proteína A.

Con referencia a las figuras 12 y 13, ratones SCID hembra de 8 a 10 semanas de edad fueron implantados con cinco millones de células de cáncer pancreático humano (BxPC-3) en

25 100 microlitros de solución PBS inyectada subcutáneamente en

el pescuezo. Los ratones fueron divididos aleatoriamente en tres grupos de tratamiento de nueve cuando el volumen tumoral de ratón promedio alcanzó aproximadamente 100 mm³. El día 43 después de la implantación, 0 mg/kg de anticuerpo de prueba 5 AR40A746.2.3 o control con regulador de pH se administraron intraperitonealmente a cada cohorte en un volumen de 300 µl después de una dilución a partir de la concentración de abastecimiento con un diluyente que contenía 2.7 mM de KCl, 1 mM de KH₂PO₄, 137 mM de NaCl y 20 mM de Na₂HPO₄, tres veces 10 por semana para un total de 10 dosis. 13.3 mg/kg de F(ab')₂ de AR40A746.2.3 se administraron diariamente intraperitonealmente para un total de 19 dosis. Se midió el crecimiento de tumor aproximadamente cada 7 días con calibres. Los pesos corporales de los animales se registraron 15 al mismo tiempo que la medición del tumor. Todos los animales fueron sometidos a eutanasia de acuerdo con los lineamientos de CCAC al final del estudio una vez que hubieron alcanzado el parámetro.

Tanto AR40A746.2.3 como F(ab')₂ de AR40A746.2.3 20 redujeron crecimiento de tumor en el modelo establecido *in vivo* de BxPC-3 de cáncer pancreático humano. Los tratamientos con el anticuerpo Arius AR40A746.2.3 y F(ab')₂ de AR40A746.2.3 redujeron significativamente el crecimiento de tumores BxPC-3 en 67.6 por ciento (p<0.0011, prueba t) y 51.7 25 por ciento (p<0.0098, prueba t), respectivamente, en

comparación con el grupo tratado con regulador de pH, como se determina el día 69, 5 días después de la última dosis de anticuerpo (figura 12).

No hubo señales clínicas de toxicidad a lo largo del estudio. El peso corporal medido a intervalos semanales fue un sustituto para bienestar y falla de desarrollo. El peso corporal medio permaneció aproximadamente igual en todos los grupos durante la duración del estudio (figura 3). No hubo diferencias significativas entre los grupos al final del periodo de tratamiento.

En resumen, tanto AR40A746.2.3 como $F(ab')_2$ de AR40A746.2.3 fueron bien tolerados y redujeron significativamente la carga tumoral en este modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano.

Ejemplo 8

Experimento de tumor in vivo con células de cáncer pancreático BxPC-3 humano

En los ejemplos 3, 4, 6 y 7, AR40A746.2.3 demostró actividad *in vivo* contra modelos de xenoinjerto de cáncer pancreático humano. Para comparar esta actividad con el agente quimioterapéutico químicamente relevante, gemcitabina y para determinar si la actividad del anticuerpo podría ser incrementada en combinaciones de anticuerpo quimioterapéuticos, AR40A746.2.3 y gemcitabina se usaron

solos y en combinación en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático BxPC-3 humano establecido. Con referencia a las figuras 14, 15, 16, 17 18 y 19, ratones atímicos hembra de 7 a 8 semanas de edad fueron implantados subcutáneamente con un
5 fragmento de tumor BxPC-3 (1 mm^3 ; la línea de células de cáncer pancreático BxPC-3 se mantuvo en ratones desnudos atímicos mediante pasaje en serie) en el flanco derecho. Los tumores fueron monitoreados dos veces por semana y después diariamente al acercarse sus volúmenes a $80\text{-}120\text{ mm}^3$. El día 1
10 del estudio, los animales fueron clasificados en 6 grupos de tratamiento de 9-0 con tamaños de tumor de $62.5\text{-}126.0\text{ mm}^3$ y con tamaños de tumor promedio de $86\text{-}87.3\text{ mm}^3$. Todos los agentes fueron administrados intraperitonealmente. El anticuerpo de prueba AR40A746.2.3 a 20 mg/kg o control de
15 regulador de pH se administró tres veces por semana durante tres semanas y se administró a cada cohorte en un volumen de 200 microlitros después de la dilución a partir de la concentración de abastecimiento con un diluyente que contenía 2.7 mM de KCl, 1 mM de KH_2PO_4 , 137 mM de NaCl y 20 mM de
20 Na_2HPO_4 . Se dio gemcitabina una vez al día los días 1, 4, 7 y 10. Los ratones del grupo de control recibieron el regulador de pH PBS, 3x/semana durante 3 semanas. Los grupos 2 y 3 recibieron monoterapias con gemcitabina a 160 y 80 mg/kg , respectivamente. El grupo 4 recibió monoterapia con
25 AR40A746.2.3. El grupo 5 y 6 recibió gemcitabina a 160 y 80

mg/kg, respectivamente, en combinación con AR40A746.2.3. El crecimiento del tumor se midió una vez cada 3-4 días con calibres. El tratamiento se completó después de 9 dosis de anticuerpo y 4 dosis de gemcitabina. El volumen de criterio
5 para el crecimiento de tumor fue 1000 mm³. Los resultados de tratamiento de los grupos tratados con anticuerpo contra tratados con vehículo se presentaron como (i) retraso de crecimiento de tumor porcentual (TGD), el cual se identifica como el incremento porcentual en el tiempo medio para el
10 criterio (TTE), y (ii) inhibición de crecimiento de tumor porcentual (TGI), que se define como la reducción en el volumen de tumor medio. Los pesos corporales de los animales se registraron al mismo tiempo que la medición del tumor. Todos los animales fueron sometidos a eutanasia de acuerdo
15 con los lineamientos de CCAC al final del estudio una vez que hubieron alcanzado el parámetro.

La monoterapia con AR40A746.2.3 demostró cero por ciento de TGD, pero produjo un sobreviviente de 72 días con un tumor de 80 mm³. La gemcitabina produjo 9 por ciento y
20 cero por ciento de TGD a 160 y 80 mg/kg, respectivamente, y no produjo sobrevivientes a 72 días. Las combinaciones de AR40A746.2.3 con 160 y 80 mg/kg de gemcitabina produjeron 9 por ciento y 22 por ciento de TGD, respectivamente. La combinación de alta dosis, sin embargo, produjo dos
25 sobrevivientes de 72 días con un volumen de tumor medio de

612 mm³. Así como dos animales con valores TTE de más de 58 días. La combinación de bajas dosis produjo un sobreviviente con un volumen de tumor medio de 550 mm³, así como un animal con un TTE de 69.5 días. Ningún tratamiento de combinación
5 logró una actividad estadísticamente significativa debido, en parte, a la velocidad de crecimiento de tumor variable en el control de tumor tratado con vehículo (figuras 14 y 15).

Ambas combinaciones inhibieron el crecimiento de tumor medio a partir del día 1 hasta el día 13. El análisis de
10 los volúmenes de tumor el día 13 indica que 160 y 80 mg/kg de monoterapias de gemcitabina produjo un 27 por ciento y 56 por ciento significativos de TGI ($p < 0.05$, prueba *U* de Mann-Whitney), en tanto que la monoterapia con AR40A746.2.3 demostró un insignificante 16 por ciento de TGI. AR40A746.2.3 a 20 mg/kg
15 en combinación con 160 u 80 mg/kg de gemcitabina produjeron un altamente significativo 53 por ciento y 56 por ciento de TGI ($p < 0.001$, prueba *U* de Mann-Whitney) (figuras 14 y 15).

No hubo señales clínicas obvias de toxicidad a lo largo del estudio. El peso corporal medido a intervalos
20 semanales fue un sustituto para bienestar e incapacidad de desarrollo. Pérdidas de peso corporal medias de grupo máximo insignificantes (<1 por ciento) ocurrieron en el grupo 2 (monoterapia con gemcitabina a 160 mg/kg) y grupo 5 (AR40A746.2.3 en combinación con gemcitabina a 160 mg/kg). No
25 hubo diferencias significativas entre los grupos durante el

periodo de tratamiento (figuras 18 y 19).

En resumen, análisis de clasificación logarítmica de valores TTE indican que la monoterapia con AR40A746.2.3 o gemcitabina o sus combinaciones produjeron actividades contra xenoinjertos de cáncer pancreático BxPC-3. El día 13, cada anticuerpo o quimioterapia o su combinación excepto monoterapia con AR40A746.2.3, produjeron TGI estadísticamente significativo. Los resultados demuestran una tendencia dependiente de dosis hacia actividad terapéutica: 40 por ciento y 20 por ciento de los animales tratados con las combinaciones de 160 y 80 mg/kg de gemcitabina/ AR40A746.2.3, respectivamente, experimentaron supervivencia prolongada sustancialmente, mientras que el porcentaje de los ratones tratados con monoterapia que experimentaron supervivencia prolongada sustancialmente fue de 11-12.5 por ciento (figuras 17 y 18).

Ejemplo 9

Experimento de tumor in vivo con células de cáncer MDA-MB-231

20 humano

Con referencia a las figuras 20 y 21, ratones SCID hembra de 8 a 10 semanas de edad fueron implantados con 5 millones de células de adenocarcinoma de seno humano (MDA-MB-231) en 100 microlitros de solución PBS, inyectadas subcutáneamente en el flanco derecho de cada ratón. Los

ratones fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de tratamiento de 10. Un día después de la implantación, 20 mg/kg de anticuerpo de prueba AR40A746.2.3 o control de regulador de pH se administraron intraperitonealmente a cada

5 cohorte en un volumen de 300 microlitros, después de dilución a partir de la concentración de abastecimiento con una solución de regulador de pH PBS. Las muestras de anticuerpo de control fueron después administradas una vez por semana durante 7 semanas. Se midió el crecimiento de tumor una vez a

10 la semana con calibres. El tratamiento se completó después de 8 dosis de anticuerpo. Los pesos corporales de los animales se registraron cuando los tumores se midieron durante la duración del estudio. Al final del estudio todos los animales fueron sometidos a eutanasia de acuerdo con los lineamientos

15 de CCAC cuando alcanzaron el criterio.

AR40A746.2.3 inhibió significativamente crecimiento de tumor en el modelo profiláctico *in vivo* MDA-MB-231 de adenocarcinoma de seno humano. El tratamiento con el anticuerpo ARIUS AR40A746.2.3 redujo el crecimiento de

20 tumores MDA-MB-231 en 80.6 por ciento ($p < 0.00001$, prueba t) en comparación con el grupo tratado con regulador de pH, como se determinó el día 56, 6 días después de que se administró la última dosis de anticuerpo (figura 20).

No hubo señales clínicas obvias de toxicidad a lo

25 largo del estudio. El peso corporal medido a intervalos

semanales fue sustituto para bienestar e insuficiencia de desarrollo. El peso corporal promedio se incrementó en todos los grupos durante la duración del estudio (figura 21). El incremento de peso promedio entre el día 0 y día 56 fue +2.76 g (+13.6 por ciento) en el grupo de control y +2.59 (+12.6 por ciento) en el grupo tratado con AR40A746.2.3. No hubo diferencias significativas entre grupos durante el periodo de tratamiento.

En resumen, AR40A746.2.3 fue bien tolerado e inhibió significativamente el crecimiento de tumor en este modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma de seno humano el día 56.

Ejemplo 10

Tejidos normales humanos

Estudios de IHC se llevaron a cabo para caracterizar la distribución del antígeno AR40A746.2.3 en tejidos normales humanos. Cincuenta y nueve tejidos normales humanos representados en una disposición de tejido (Imagenex, San Diego, CA) fueron probados. Experimentos previos se llevaron a cabo para optimizar las condiciones de unión IHC del anticuerpo. Secciones de tejido fueron desparafinizadas por secar en un horno a 58°C durante 1 hora y se desparafinizaron al sumergir en xileno 5 veces durante 4 minutos cada uno en frascos Coplin. Después del tratamiento a través de una serie de lavados con etanol graduados (100 a 75.

por ciento) las secciones fueron rehidratadas en agua. Los portaobjetos fueron sumergidos en 10 mM de regulador de pH citrato a pH 6 (Dako, Toronto, Ontario) después sometidos a microondas a ajustes de potencia alta, media y baja durante 5 minutos cada uno y finalmente se sumergieron en PBS frío. Los portaobjetos fueron después sumergidos en 3 por ciento de solución de peróxido de hidrógeno durante 6 minutos, lavados con PBS tres veces durante 5 minutos cada una, secados e incubados con solución de bloqueo universal (Dako, Toronto, Ontario) durante 5 minutos a temperatura ambiente. AR40A746.2.3 o anticuerpo de control de isotipo (dirigido hacia glucosa oxidasa de *Asperillus niger*, una enzima que ni está presente ni es inducida en tejidos de mamífero; Dako, Toronto, Ontario) se diluyó en regulador de pH de dilución de anticuerpos (Dako, Toronto, Ontario) hasta su concentración de trabajo 5 microgramos/mL por cada anticuerpo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Anti-actina de ratón monoclonal (Dako, Toronto, Ontario) se diluyó hasta su concentración de trabajo de 2 microgramos/mL. Los portaobjetos se lavaron con PBS 3 veces durante 5 minutos cada una. La inmunorreactividad de los anticuerpos primarios se detectó/visualizó con anticuerpos secundarios conjugados a HRP proporcionados por (Dako, Envision System, Toronto, Ontario) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esta etapa los portaobjetos

fueron lavados con PBS 3 veces durante 5 minutos cada una y una reacción de color se reveló al añadir solución de substrato de cromógeno DAB (tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina, Dako, Toronto, Ontario) para tinción con
5 inmunoperoxidasa durante 10 minutos a temperatura ambiente. El lavado de los portaobjetos en agua de la llave terminó la reacción cromogénica. Después de la contratinción con hematoxilina de Meyer (Sigma Diagnostics, Oakville, Ontario), los portaobjetos fueron deshidratados con etanoles graduados
10 (75 a 100 por ciento) y limpiados con xileno. Usando medio de montaje (Dako Faramount, Toronto, Ontario), los portaobjetos fueron tapados. Los portaobjetos fueron examinados microscópicamente usando un Axiovert 200 (Zeiss Canadá, Toronto, Ontario) e imágenes digitales fueron adquiridas y
15 almacenadas usando Northern Eclipse Imaging Software (Mississauga, Ontario). Los resultados fueron leídos, calificados e interpretados por un histopatólogo.

La unión de AR40A746.2.3 a 59 muestras de tejido normal humano se llevó a cabo usando una disposición de
20 tejido normal humano (Imgenex, San Diego, CA). Las figuras 22A-22B resumen los resultados de la tinción de AR40A746.2.3 de varios tejidos normales humanos. El anticuerpo AR40A746.2.3 mostró unión predominantemente a tejidos epiteliales (figura 24, Panel B y D). Además, se observó la
25 unión a tejidos de nervio conectivo, muscular y periférico.

La localización celular fue predominantemente membranosa. Se observó tinción citoplásmica en las células de algunos de los tejidos. El anticuerpo de control positivo anti-actina mostró unión específica a tejidos musculares. El control negativo de isotipo IgG no mostró unión a ninguno de los tejidos probados.

Ejemplo 11

Tejidos de tumor humano

Se llevaron a cabo estudios IHC para caracterizar la prevalencia del antígeno AR40A746.2.3 en cánceres humanos. Cincuenta y nueve tejidos de tumor humano de una disposición (Imgenex, San Diego, CA) y otros 12 tejidos de tumor y tejidos normales representativos de otra disposición (Tri Star, Rockville, MD) fueron probados. Se llevaron a cabo experimentos previos para optimizar las condiciones de unión IHC del anticuerpo. Secciones de tejido fueron desparafinizadas al secar en un horno a 85°C durante 1 hora y se desparafinizaron al sumergir en xileno 5 veces durante 4 minutos cada uno en frascos Coplin. Después del tratamiento a través de una serie de lavados con etanol graduado (100 a 75 por ciento), las secciones fueron rehidratadas en agua. Los portaobjetos fueron sumergidos en 10 mM de regulador de pH de citrato a pH 6 (Dako, Toronto, Ontario) después sometidos a microondas en ajustes de potencia alto, medio y bajo durante

5 minutos cada uno y finalmente sumergidos en PBS frío. Los portaobjetos fueron después sumergidos en solución de peróxido de hidrógeno al 3 por ciento durante 6 minutos, lavados con PBS tres veces durante 5 minutos cada una, 5 secados e incubados con solución de bloqueo Universal (Dako, Toronto, Ontario) durante 5 minutos a temperatura ambiente. AR40A746.2.3 o anticuerpo de control de isotipo (dirigido hacia glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, una enzima que ni está en presente ni es inducible en tejidos de mamífero; 10 Dako, Toronto, Ontario) fueron diluidos en regulador de pH de dilución de anticuerpo (Dako, Toronto, Ontario) hasta su concentración de trabajo (5 microgramos/mL para cada anticuerpo) e incubados durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara humidificada. La anti-acción se diluyó hasta 15 con su concentración de trabajo de 2 microgramos/mL. Los portaobjetos fueron lavados con PBS 3 veces durante 5 minutos cada una. La inmunorreactividad de los anticuerpos primarios se detectó/visualizó con anticuerpos secundarios conjugados HRP suministrados por (Dako Envision System, Toronto, 20 Ontario) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esta etapa los portaobjetos fueron lavados con PBS 3 veces durante 5 minutos cada una y una reacción de color se desarrolló al añadir una solución de substrato cromógeno tetraclorhidrato de (3,3'-diaminobencidina DAB, Dako, 25 Toronto, Ontario) para tinción con inmunoperoxidasa durante

10 minutos a temperatura ambiente. El lavado de los portaobjetos en agua de la llave concluyó con la reacción cromogénica. Después de la contratinción con hematoxilina de Meyer (Sigma Diagnostics, Oakville, Ontario), los
5 portaobjetos fueron deshidratados con etanoles graduados (75 a 100 por ciento) y limpiados con xileno. Usando medios de montaje (Dako Faramount, Toronto, Ontario) los portaobjetos fueron tapados. Los portaobjetos fueron examinados microscópicamente usando un Axiovert 200 (Zeiss Canadá,
10 Toronto, Ontario) y las imágenes digitales adquiridas y almacenadas usando Northern Eclipse Imaging Software (Mississauga, Ontario). Los resultados fueron leídos, calificados e interpretados por un histopatólogo.

Las figuras 23A-23C resumen los resultados de la
15 unión del anticuerpo a varios tejidos tumorales humanos de dos disposiciones de tejidos diferentes. Sesenta y seis muestras de tumor fueron interpretables. Hubo una tinción moderada a fuerte de las células tumorales en 25/66 (38 por ciento) de los tumores probados incluyendo; melanoma maligno,
20 carcinoma de células escamosas de varios órganos (incluyendo el esófago), carcinoma de células transitorias del riñón y vejiga, carcinoma de células renales de riñón, adenocarcinoma de próstata, glioblastoma multiforme de cerebro, carcinoma folicular de tiroides, carcinoma endometrial y carcinoma
25 gástrico metastásico a hígado (figura 24, Panel A y C). La

tinción débil y equívoca se observó en 23/66 (35 por ciento) de muestras de tejido de tumor probadas. La localización celular fue predominantemente membranosa, tinción citoplásmica se observó también en las células tumorales de algunos de los tejidos. En los tejidos normales, el aticuerpo 5 mostró unión predominantemente tejidos epiteliales lo cual coincide con los datos delineados en el ejemplo 9. No se observó ninguna unión a músculo esquelético o cerebro. No hubo sobre-expresión del epítipo AR40A746.2.3 en tejidos de 10 tumor contra normales incluyendo el pulmón y cerebro. El aticuerpo de control positivo anti-actina mostró unión específica a tejidos musculares. El control negativo de isotipo IgG no mostró unión a ninguno de los tejidos probados. Estos resultados demuestran que el epítipo AR40A746.2.3 se 15 encuentra en células cancerosas y es sobre-expresado en algunos tejidos de tumor.

Ejemplo 12

Tejido d tumor humano pancreático

20 Se llevaron a cabo estudios IHC para caracterizar más la prevalencia del antígeno AR40A746.2.3 en cánceres pancreáticos humanos. Treinta y tres tejidos de cáncer pancreático y 4 tejidos pancreáticos no neoplásicos representativos fueron probados de una microdisposición de 25 tejido humano (Petagen, ISU ABXIS Co, Seúl, Corea del Sur).

Las muestras de tejido canceroso estuvieron por duplicado para cada caso. La puntuación final representa la intensidad de tinción predominante más alta de ambas muestras de tumor. Se llevaron a cabo experimentos previos para optimizar las

5 condiciones de unión IHC del anticuerpo. Secciones de tejido fueron desparafinizadas al secar en un horno a 58°C durante 1 hora y desparafinizadas al sumergir en xileno 5 veces durante 4 minutos cada una en frascos Coplin. Después de tratamiento a través de una serie de lavados con etanol graduado (10 a 75

10 por ciento), las secciones fueron rehidratadas en agua. Los portaobjetos fueron sumergidos en 10 mM de regulador de pH de citrato a pH 6 (Dako, Toronto, Ontario) después sometidas a microondas a ajustes de potencia alto, medio y bajo durante 5 minutos cada uno y finalmente se sumergieron en PBS frío. Los

15 portaobjetos fueron después sumergidos en solución de peróxido de hidrógeno al 3 por ciento durante 6 minutos, lavados con PBS tres veces durante 5 minutos cada una, secados, incubados con solución de bloqueo Universal (Dako, Toronto, Ontario) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

20 AR40A746.2.3 o anticuerpo de control de isotipo (dirigido hacia glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, una enzima que ni está presente ni es inducida en tejidos de mamífero; Dako, Toronto, Ontario) se diluyó en regulador de pH de dilución de anticuerpo (Dako, Toronto, Ontario) hasta su concentración de

25 trabajo (5 microgramos/mL para cada anticuerpo) y se incubó

durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Anti-actina se diluyó hasta su concentración de trabajo de 2 micromgramos/mL. Los portaobjetos fueron lavados con PBS 3 veces durante 5 minutos cada una. La
5 inmunorreactividad de los anticuerpos primarios se detectó/visualizó en anticuerpos secundarios conjugados a HRP como fueron suministrados (Dako Envision System, Toronto, Ontario) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esta etapa los portaobjetos fueron lavados con PBS 3 veces
10 durante 5 minutos cada una y una reacción de color se reveló al añadir una solución de substrato cromógena de DAB (tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina, Dako, Toronto, Ontario) para tinción con inmunoperoxidasa durante 10 minutos a temperatura ambiente. El lavado de los portaobjetos en agua
15 de la llave concluyó la reacción cromogénica. Después de la contratinción con hematoxilina de Meyer (Sigma Diagnostics, Oakville, Ontario), los portaobjetos fueron deshidratados con etanoles graduados (75 a 100 por ciento) y aclarados con xileno. Usando medios de montaje (Dako Faramount, Toronto,
20 Ontario los portaobjetos fueron tapados. Los portaobjetos fueron examinados microscópicamente usando un Axiovert 200 (Zeiss Canadá, Toronto, Ontario) e imágenes digitales se adquirieron y almacenaron usando Northern Eclipse Imaging Software (Mississauga, Ontario). Los resultados fueron
25 leídos, calificados e interpretados por un histopatólogo.

La figura 25 resume los resultados de la unión del anticuerpo a cánceres pancreáticos en una disposición de tejido. Treinta y un muestras de tejido de tumor pancreático (incluyendo 29 adenocarcinomas y dos carcinomas endocrino) y 4 muestras de tejido normal fueron interpretables. En total, hubo una tinción moderada fuerte de las células de tumor en 1131 (36 por ciento) y equívoca a débil en 12/31 (39 por ciento) de los tejidos de tumor probados. Para lo adenocarcinomas, hubo una tinción moderada a fuerte de las células de tumor en 929 (31 por ciento) y equívoca a débil en 12/29 (41 por ciento) de los tejidos de tumor probados. Para tumores endocrinos, hubo una tinción moderada a fuerte en ambas muestras probadas (2/2). Hubo una tendencia hacia unión más alta con grados histológicos más altos (G2-3, G3 y G4. No hubo correlación obvia de la unión de anticuerpo con etapas de tumor TNM. La ubicación celular fue predominantemente membranosa, tinción citoplásmica también se observó en células de tumor de algunos de los tejidos probados.

En los 4 tejidos pancreáticos no neoplásicos probados, hubo tinción moderada a fuerte en 1/4 (25 por ciento) y equívoca a débil en 3/4 (75 por ciento) de los tejidos de tumor probados. La unión fue predominantemente a tejidos epiteliales. El anticuerpo de control positivo anti-actina mostró unión específica a tejidos musculares. El control negativo de isotipo IgG no mostró unión a ninguno de

los tejidos probados. Al comparar la intensidad de la unión de AR40A746.2.3 a cánceres pancreáticos y tejidos pancreáticos no neoplásicos, hubo sobre-expresión del epítipo marcado por AR40A746.2.3 en tejidos pancreáticos humanos neoplásicos (figura 26A) contra no neoplásicos (figura 26B). Estos resultados demuestran que el epítipo reconocido por AR40A746.2.3 es expresado en cánceres pancreáticos y es sobre-expresado en tejido pancreático de tumor contra normal.

10

Ejemplo 13

Reactividad cruzada a tejidos normales humanos y de otras especies

Se llevaron a cabo estudios IHC para evaluar la reactividad cruzada de AR40A746.2.3 a tejidos de especies no humanas para de esta manera encontrar modelos de toxicología preclínica adecuados. Todos los tejidos usados fueron incrustados en parafina fija en formalina. La unión de AR40A746.2.3 a 8 tejidos normales de macaco y rhesus (Biochain, CA, E.U.A.) y 10 tejidos normales de conejo, rata, ratón y borrego (Zymed laboratorios, Inc, CA, E.U.A.) se llevó a cabo usando microdisposiciones tisulares. Se llevaron a cabo experimentos previos para optimizar las condiciones de unión IHC del anticuerpo. Secciones de tejido fueron desparafinizadas al secar en un horno a 58°C durante 1 hora y desparafinizadas al sumergir en xileno 5 veces durante 4

minutos cada uno en frascos Coplin. Después de tratamiento a través de una serie de lavados con etanol graduado (100 a 75 por ciento) las secciones fueron rehidratadas en agua. Los portaobjetos fueron sumergidos en 10 mM de regulador de pH de citrato a pH 6 (Dako, Toronto, Ontario) después sometidos a microondas a ajustes de potencia alto, medio y bajo durante 5 minutos cada uno y finalmente sumergidos en PBS frío. Los portaobjetos fueron después sumergidos en solución de peróxido de hidrógeno al 3 por ciento durante 6 minutos, lavados con PBS tres veces durante 5 minutos cada una, secados e incubados con solución de bloqueo universal (Dako, Toronto, Ontario) durante 5 minutos a temperatura ambiente. AR40A746.2.3, anti-actina de ratón monoclonal (Dako, Toronto, Ontario) o anticuerpo de control de isotipo (dirigido hacia glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, una enzima que ni está presente ni es inducible en tejidos de mamífero; Dako, Toronto, Ontario) se diluyó en regulador de pH de dilución de anticuerpo (Dako, Toronto, Ontario) hasta su concentración de trabajo (5 microgramos/mL) excepto anti-actina la cual se diluyó a 2 microgramos/mL y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Los portaobjetos fueron lavados con PBS 3 veces durante 5 minutos cada una. La inmunorreactividad de los anticuerpos primarios se detectó/visualizó con anticuerpos secundarios conjugados a HRP proporcionados (Dako Envision System, Toronto, Ontario)

durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esta etapa los portaobjetos se lavaron con PBS tres veces durante 5 minutos cada una y una reacción de color se reveló al añadir solución de substrato cromógeno de DABA (5 tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina, Dako, Toronto, Ontario) para tinción con inmunoperoxidasa durante 10 minutos a temperatura ambiente. El lavado de los portaobjetos en agua de la llave concluyó la reacción cromogénica. Después de la contratinción con hematoxilina de Meyer (Sigma Diagnostics, 10 Oakville, Ontario), los portaobjetos fueron deshidratados con etanoles graduados (75 a 100 por ciento) y aclarados con xileno. Usando medios de montaje (Dako Faramount, Toronto, Ontario) los portaobjetos fueron tapados. Los portaobjetos se examinaron microscópicamente usando un Axiovert 200 (Zeiss 15 Canadá, Toronto, Ontario) y las imágenes digitales se adquirieron y almacenaron usando Northern Eclipse Imaging software (Mississauga, Ontario). Los resultados fueron leídos, calificados e interpretados por un histopatólogo.

Algunos de los tejidos no fueron representativos y 20 en consecuencia no estuvieron incluidos en la interpretación final. La figura 27 presenta un resumen de los resultados de la unión de AR40A746.2.3 a tejidos normales de macaco, rhesus, conejo, ratón, rata y borrego en comparación con la unión del anticuerpo a tejidos normales humanos probados 25 previamente (ejemplo 9). El anticuerpo AR40A746.2.3 mostró

unión predominantemente a los tejidos epiteliales, células inflamatorias y tejidos neurales de humano (figura 28A), macaco (28B), mono rhesus (28C) y conejo (28D). No se observó unión a los tejidos de ratón, rata o borrego. El anticuerpo
5 de control positivo anti-ctina mostró unión específica a tejidos musculares. El control negativo de isotipo IgG no mostró unión a ninguno de los tejidos interpretados. AR40A746.2.3 por lo tanto reacciona en forma cruzada con los tejidos normales de macaco, mono rhesus y conejo de una
10 manera similar a los tejidos normales humanos.

Ejemplo 14

Identificación de antígeno unido por AR40A746.2.3

1. Inmunoprecipitación

15 La identificación del antígeno para AR40A746.2.3 se llevó a cabo al aislar el ligando cognado a través de inmunoprecipitación de lisado solubilizado a partir de células BxPC-3. Cien microlitros de Protein G Dynabeads (Invitrogen, Burlington, Ontario) se lavaron 3 veces con 1 mL
20 de regulador de pH de fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0. Cien microgramos de AR40A746.2.3 en un volumen total de 100 microlitros de fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0 se añadieron a las esferas lavadas. La mezcla se incubó durante 1 hora con mezclado de extremo a extremo. El anticuerpo no unido se
25 removi6 y las esferas recubiertas con AR40A746.2.3 se lavaron

tres veces con 0.5 mL de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.4 que contenía 0.1 por ciento de Tween 20. Las esferas recubiertas con AR40A746.2.3 se lavaron 2 veces con 1 mL de trietanolamina 0.2 M, pH 8.2. AR40A746.2.3 se reticuló
5 químicamente a las esferas al añadir 1 mL de dimetilpimelimidato 0.2 M recién preparado en trietanolamina 0.2 M, pH 8.2 y se incubó con mezclado de extremo a extremo durante 30 minutos. La reacción se detuvo al incubar las esferas con 1 mL de Tris 0.05 M, pH 7.5 durante 15 minutos
10 con mezclado giratorio. Las esferas reticuladas a AR40A746.2.3 fueron pre-eluidas mediante incubación con citrato 0.1 M, pH 3.0 durante 3 minutos seguido por 3 lavados en PBS 0.1 M que contenía 0.1 por ciento de Tween 20. Un segundo conjunto de esferas reticuladas a anticuerpo se
15 preparó de la misma manera que la descrita usando un anticuerpo IgG1 de ratón (clon 1B7.11, purificado en casa) a trinitrofenol, el cual se usó como un control de isotipo de IgG1 negativo.

Las esferas reticuladas a AR40A746.2.3 fueron
20 bloqueadas al incubar en 0.1 por ciento de BSA en fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4 con mezcla giratoria durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las esferas se lavaron 3 veces con fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4. Cinco miligramos de una preparación de lisado de células BxPC-3 se incubó con las
25 esferas reticuladas a AR40A746.2.3 con mezclado giratorio

durante 2 horas a temperatura ambiente. Las esferas unidas a inmunocomplejo se lavaron una vez con 1 mL de 1 mM de KH_2PO_4 , 10 mM de Na_2HPO_4 , 137 mM de NaCl y 2.7 mM de KCl que contenía 0.1 por ciento de Triton X-100 seguidos por un segundo lavado
5 con 1 mL de 1 mM de KH_2PO_4 , 10 mM de Na_2HPO_4 , 637 mM de NaCl y 2.7 mM de KCl que contenía 0.1 por ciento de Triton X-100 durante 5 minutos con mezclado de extremo a extremo, seguido por un lavado final con 1 mL de 1 mM de KH_2PO_4 , 10 mM de Na_2HPO_4 , 137 mM de NaCl y 2.7 mM de KCl que contenía 0.1 por
10 ciento de Triton X-100. Catorce microlitros de regulador de pH de muestra SDS-PAGE no reductor se añadieron a las esferas unidas al inmunocomplejo lavadas y la muestra se hirvió durante 5 minutos. El sobrenadante que contenía los inmunocomplejos disociados se retiró y se colocó en un tubo microcentrífugo que
15 contenía 1 microlitro de 2-mercaptoetanol. Las esferas reticuladas al control de isotipo IgG1 (clon 1B7.11) fueron incubadas con preparación de lisado de BxPC-3 y se procesaron de la misma manera que las esferas AR40A746.2.3.

La proteína inmunoprecipitada con AR40A746.2.3 se
20 cargó en un solo pocillo de un gel de poliacrilamida al 12 por ciento junto con el inmunoprecipitado generado a partir del control de isotipo IgG1 (clon 1B7.11). Una muestra de marcadores de peso molecular MagicMark (Invitrogen, Burlington, Ontario) se cargó en un carril de referencia. El
25 gel de poliacrilamida que contenía las muestras de

inmunoprecipitado se sometió a electroforesis a 150 V durante aproximadamente 70 minutos. El gel fue teñido durante alrededor de 17 horas con tinción de proteína Coloidal Azul (Invitrogen, Burlington, Ontario), de acuerdo con las 5 direcciones del fabricante. En la figura 29 se presenta una fotografía del gel teñido. Hubo una banda presente en el inmunoprecipitado de AR40A746.2.3 a aproximadamente 25 kDa que no estuvo presente en el inmunoprecipitado del control de isotipo IgG1. En consecuencia, el área del gel que contenía 10 la banda de 25 kDa del inmunoprecipitado de AR40A746.2.3 se extirpó usando una pipeta Pasteur de vidrio, junto con el área correspondiente en el carril que contenía el inmunoprecipitado de control de isotipo IgG1 (clon 1B7.11).

2. Espectrometría de masas

15 Las piezas de gel extirpadas fueron sujetas a digestión con tripsina. Brevemente, las piezas de gel fueron desteñidas y deshidratadas en tubos microcentrífugos al llevar a cabo 2 lavados usando 50 por ciento de metanol, 10 por ciento de ácido acético durante 30 minutos cada uno con 20 agitación, seguido por incubación con 50 por ciento de acetonitrilo, bicarbonato de amonio 0.1 M durante 1 hora con agitación. Cien por ciento de acetonitrilo se añadió a las muestras y se incubó durante 15 minutos con agitación. Se retiró todo el líquido y las piezas de gel fueron 25 deshidratadas completamente por incubación a 75°C durante 10

minutos con las partes superiores de los tubos microcentrífugos dejadas abiertas. Se llevó a cabo digestión con tripsina al incubar las piezas de gel deshidratadas con 10 microlitros de 0.01 mg/mL de tripsina activada recién preparada (Pierce, Rockford, IL) durante 15 minutos, seguida por la adición de bicarbonato de amonio 25 mM. Las muestras fueron incubadas durante aproximadamente 13 horas a 37°C. Se aplicó un microlitro de cada muestra (que contenía péptidos que resultaron de la digestión con tripsina) a un punto en un chip H4 (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA) y se dejaron secar. La mitad de un microlitro de 20 por ciento de alfa-ciano-4-hidroxí-cinámico saturado en 0.5 por ciento de ácido trifluoroacético, 50 por ciento de acetonitrilo se aplicó dos veces a cada punto. Los espectros para cada muestra se obtuvieron en un espectrómetro de masas PBS-IIc (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA). Una perspectiva general de los espectros obtenidos para cada muestra se muestra en la figura 30. Los espectros fueron escaneados visualmente y los picos específicos para la digestión de AR40A746.2.3 comparados con la digestión del control de isotipo IgG1 (clon 1B7.11) fueron marcados. Diez picos distintos fueron identificados en la digestión del inmunoprecipitado de AR40A746.2.3 que no estuvieron presentes en la digestión del control de isotipo IgG1. Para identificar de manera precisa la proteína inmunoprecipitada por AR40A746.2.3, se llevó a cabo

espectrometría de masas en tándem en uno de los péptidos presentes en la digestión de triptico de AR40A746.2.3. Un segundo chip H4 se preparó de la misma manera que la descrita arriba y un péptido de 1570 Da presente en la digestión de

5 AR40A746.2.3 se analizó mediante disociación inducida por colisión usando un espectrómetro de masas en tándem Q-ToF para generar así la secuencia de aminoácido de ese péptido. La secuencia de aminoácidos determinada para el péptido de 1570 Da se escrutó usando una base de datos de mapeo de

10 péptidos Mascot (Matrix Science Ltd, Londres, Reino Unido). Una concidencia de alta confianza con CD9 humana se regresó de la base de datos.

3. Confirmación de identidad del antígeno

La confirmación de CD9 como el antígeno objetivo de

15 AR40A746.2.3 se llevó a cabo al llevar a cabo inmunoprecipitaciones cruzadas para determinar si un anticuerpo anti-CD9 conocido reaccionaría con la proteína inmunoprecipitada por AR40A746.2.3 y viceversa. Esferas reticuladas a anticuerpos e inmunoprecipitados se prepararon

20 de la misma manera que la descrita usando los anticuerpos AR40A746.2.3, control de isotipo de IgG1 (clon 1B7.11) y anti-CD9 (clon MEM-61; Abcam, Cambridge, MA). El inmunoprecipitado de AR40A746.2.3, inmunoprecipitado de anti-CD9 (clon MEM-61), inmunoprecipitado de control de isotipo de

25 IgG1 (clon 1B7.11) y lisado de BxPC-3 fueron separados

mediante SDS-PAGE en trece geles de poliacrilamida al 12 por ciento replicados. Se llevó a cabo electroforesis como se describió arriba. Las proteínas fueron transferidas del gel a membranas de PVDF (Millipore, Billerica, MA) mediante electroblotting durante 16 horas a 40 V. Después de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con 5 por ciento de leche en polvo descremada en TBST durante 2 horas. Las membranas fueron sondeadas ya sea con AR40A746.2.3, control de isotipo IgG1 (clon 1B7.11) o anti-CD9 (clon MEM-61) diluido en 3 por ciento de leche en polvo descremada en TBST a una concentración de 5 microgramos/mL durante 2 horas. Después de lavar 3 veces con TBST durante 10 minutos cada una, las membranas se incubaron con IgG anti-ratón de cabra (Fc) conjugado HRP durante 1 hora. Esta incubación fue seguida por lavado 3 veces con TBST durante 10 minutos cada uno, seguido por incubación con solución ECL durante 5 minutos. Las membranas fueron expuestas a película, y la película se reveló. Los resultados de los Western Blots de inmunoprecipitación cruzada se muestran en la figura 31. Cuando AR40A746.2.3 se usó como anticuerpo primario en el Western Blot (Panel A) reaccionó fuertemente a su auto-inmunoprecipitado, así como el inmunoprecipitado de anti-CD9 (clon MEM-61) y lisado de BxPC-3. También parece haber una banda a aproximadamente 25 kDa en el inmunoprecipitado de control de isotipo de IgG1 (clon 1B7.11). Sin embargo, esto

es muy probablemente no específico dado que se observa a través de todos los carriles, incluyendo los estándares de peso molecular. Cuando se usó anti-CD9 (clon MEM-61) como un anticuerpo primario en el Western Blot (Panel B), reaccionó fuertemente con AR40A746.2.3, así como se detectó una banda a aproximadamente 25 kDa en su auto-inmunoprecipitado y en el lisado BxPC-3. El Western Blot sondeado con control de isotipo IgG1 (clon 1B7.11; Panel C) tuvo reactividad en regiones de alto peso molecular que correspondían a tamaños de fragmentos de anticuerpo contaminantes en los inmunoprecipitados, mientras que no hubo reactividad en la región de 25 kDa en ninguna muestra. Los resultados de los Western Blots de inmunoprecipitación cruzada demuestran que la proteína inmunoprecipitada AR40A746.2.3 y reconocida por anticuerpo anti-CD9 (clon MEM-61), y que el inmunoprecipitado de anti-CD9 (clon MEM-61) se reconoce por AR40A746.2.3.

La identificación espectroscópica de masas combinada con la confirmación usando un anticuerpo comercial conocido demuestra que el antígeno para AR40A746.2.3 es CD9.

20

Ejemplo 15

Secuencia de murino de AR40A746.2.3

1.0 Clonación de genes de región variable en vectores de secuenciación

Los genes que codifican para las regiones variables

de las cadenas tanto pesada como ligera fueron clonados por separado en el vector de secuenciación comercial pCR2.1 (Invitrogen, Burlington, Ontario).

1.1 Aislamiento de ARNm

5 Acido ribonucleico total (ARN) fue aislado de un vial de células de hibridoma AR40A746.2.3 de Banco de Células Maestro congeladas usando Absolutely RNA[®] Miniprep kit (Stratagene, La Jolla, CA). El ARN se almacenó a -80°C hasta que se requirió para uso adicional.

10 1.2 RT-PCR y amplificación de genes de región variable

Reacciones separadas se llevaron a cabo para amplificar las regiones variables de la cadena ligera y pesada. La reacción en cadena de la polimerasa de
15 transcriptasa inversa (RT-PCR) sintetizó ácido desoxinucleico complementario (ADNc) de la plantilla de ARN total, y luego amplificó específicamente el gen seleccionado.

Para las cadenas tanto ligera como pesada, un microgramo del ARN total se combinó con microlitro de
20 trifosfatos de desoxirribonucleótido 10 milimolar (dNTP), y 0.2 microlitros de cebador 10 micromolar. Cebador RT ligero (Arius CODE:olg-06-118; figura 32) se usó para la reacción de la cadena ligera y cebador nMuIgGVh3'-2 (Arius CODE:olg-06-98, figura 32) se usó para la reacción de la cadena pesada.
25 Las mezclas se incubaron a 65°C durante 5 minutos, y luego se

enfriaron en hielo durante 1 minuto. Reacciones de ADNc de primera hebra se prepararon usando SuperScript III™ FT-PCR System (Invitrogen, Burlington, Ontario).

Para amplificar la región variable de la cadena
5 ligera o cadena pesada, cada reacción de PCR contenía 2
microlitros de ADNc de primera hebra preparado a partir de la
reacción de RT-PCR, 5 microlitros de regulador de pH 10X HI-
FI PCR (Invitrogen, Burlington, Ontario), 1.0 microlitro de
dNTPs 25 micromolar (Bio Basic Inc., Markham, Ontario), 1
10 microlitro de cebador hacia adelante 10 micromolar, 1
microlitro de cebador hacia atrás 10 micromolar, 0.2
microlitros de ADN Polimerasa Taq Platinum HI-FI (Invitrogen,
Burlington, Ontario) y 39.6 microlitros de agua.

Para la PCR de cadena ligera, el cebador inverso
15 fue ya sea cebador de Luz RT (Arius CODE:olg-06-118; Figura
32) o nMuIgKVL3'-1 (Arius CODE:olg-06-115; figura 32) y el
cebador hacia adelante fue uno de los cebadores nMuIgKVL5'-F3
(Arius CODE:olg-06-109, figura 32), 40^a746Vk-15F (Arius
CODE:olg-06-219; figura 32).

20 Para amplificar la región variable de la cadena
pesada, el cebador hacia atrás fue el cebador nMuIgGVh3'-2
(Arius CDE:olg-06-98, figura 32) y el cebador hacia adelante
fue uno de los cebadores nMuIgVh5'-F3 (Arius CODE:olg-06-95,
figura 32), 40^a746Vh-26F (Arius CODE:olg-06-217; figura 32) o
25 40^a746Vh-8F (Arius CODE:olg-06-218; figura 32).

Todas las reacciones de PCR se incubaron en un termociclizador durante 2 minutos a 95°C, seguido por 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 2 minutos y 68°C durante 1 minuto y 1 incubación final de 68°C durante 7 minutos. Las reacciones se almacenaron a 4°C hasta que se requirieran. Diez microlitros de cada reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1.2 por ciento y se visualizaron con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta.

Los productos de PCR de las reacciones de la cadena ligera y pesada amplificadas se purificaron usando el kit de Purificación de PCR QiAquick (QIAGEN, Mississauga, Ontario).

1.3 Clonación en vectores de secuenciación

Productos de PCR purificados de cadena ligera y pesada fueron clonados por separado en el vector pCR2.1 usando el kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen, Burlington, Ontario). Las reacciones contenían 4 microlitros de producto de PCR purificado. Después de la ligación, 3 microlitros se transformaron en One Shot® MACH-1™-TI^R *E. coli* (Invitrogen, Burlington, Ontario). Cincuenta microlitros de las células transformadas se plaquearon sobre placas de agar de caldo L (LB) Lennox precalentadas (Sigma, Oakville, Ontario) que contenían 50 microgramos/mL de ampicilina (Sigma, Oakville, Ontario) y 40 microlitros de 40 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosida (X-gal, Caledon Laboratories, Georgetown, Ontario) en N,N-dimetilformamida

(Caledon Laboratories, Georgetown, Ontario). Las placas fueron invertidas e incubadas a 37°C durante la noche.

Cuatro o más colonias blancas individuales con ADN recombinante de cada placa transformada se usaron para
 5 inocular cultivos de 4 mililitros de caldo LB que contenían 50 microgramos por mililitro de ampicilina durante la noche a 37°C mientras se agitaba. Los plásmidos se aislaron de estos cultivos nocturnos usando el kit QIAprep Spin Microprep (QIAGEN, Mississauga, Ontario). Los plásmidos con cadena
 10 ligera (MBPP 953, 954, 956, 960, 961, 963, 965-973) o insertos de cadena pesada (MBPP 991-1002) fueron secuenciados en Quintara (Berkeley, CA, E.U.A.). Los datos de secuenciación se analizaron usando software Vector NTI (Invitrogen, Burlington, Ontario) para obtener secuencias de
 15 ADN y proteínas. Las secuencias de proteínas de las cadenas ligera y pesada se dan como SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:7 respectivamente (figura 31). Las regiones de CDR y la numeración de las secuencias se dan de acuerdo con Kabat.

20

Ejemplo 16

Aislamiento de aglutinantes competitivos

Dado un anticuerpo, alguien capacitado ordinariamente en la técnica puede generar un CDMAB de inhibición competitiva, por ejemplo un anticuerpo
 25 competente, el cual es uno que reconoce el mismo epítopo

(Belanger L et al., *Clinica Chimica Acta* 48:15-18 (1973)).
Un método implica inmunizar con un inmunógeno que exprese el
antígeno reconocido por el anticuerpo. La muestra puede
incluir pero no está limitada a tejidos, proteínas aisladas
5 o líneas de células. Los hibridomas resultantes pueden ser
tamizados usando un ensayo de competencia, el cual es uno
que identifique anticuerpos que inhiben la unión del
anticuerpo de prueba, tal como ELISA, FACS o Western
Blotting. Otro método podría hacer uso de bibliotecas de
10 anticuerpos de despliegue de fagos y paneo para anticuerpos
que reconozcan al menos un epítipo del antígeno (Rubinstein
JL et al *Anal Biochem* 314:294-300 (2003)). En cualquier
caso, se seleccionan anticuerpos con base en su capacidad
para desplazar la unión del anticuerpo marcado original a
15 por lo menos un epítipo de su antígeno objetivo. Estos
anticuerpos podrían poseer por lo tanto la característica de
reconocer al menos un epítipo del antígeno como el
anticuerpo original.

20

Ejemplo 17

Clonación de las regiones variables del anticuerpo monoclonal

AR40A746.2.3

Las secuencias de las regiones variables de las
cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) del anticuerpo monoclonal
25 producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3

se determinaron previamente (como se describe en el ejemplo 14). Para generar IgG quimérica y humanizada, los dominios de la cadena pesada variable y ligera variable pueden ser subclonados en un vector adecuado para expresión.

- 5 En otra modalidad, AR40A746.2.3 o su versión des-
inmunizada, quimérica o humanizada se produce al expresar un
ácido nucleico que codifique para el anticuerpo en un animal
transgénico, de tal forma que el anticuerpo sea expresado y
pueda ser recuperado. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser
10 expresado de una manera específica de tejido que facilite la
recuperación y purificación. En una de estas modalidades, un
anticuerpo de la invención es expresado en las glándulas
mamarias para secreción durante lactancia. Animales
transgénicos incluyen pero no están limitados a ratones,
15 cabras y conejos.

(i) Anticuerpo Monoclonal

- ADN codificado para el anticuerpo monoclonal (como
el descrito en S.N. 11/709,676) es fácilmente aislado y
secuenciado usando procedimientos convencionales (por
20 ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de
unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas
pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). La célula
de hibridoma sirve como una fuente preferida de este ADN. Una
vez aislado, el ADN puede ser puesto en vectores de
25 expresión, los cuales son después transfectados en células

hospederas tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospederas recombinantes. El ADN también puede ser modificado, por ejemplo, al sustituir la secuencia de codificación por los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias de murino homólogas. Los anticuerpos quiméricos o híbridos también pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que incluyen agentes de reticulación. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio disulfuro o al formar un enlace de tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato de metil-4-mercaptobutirimidato.

(ii) Anticuerpo Humanizado

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en éste desde una fuente no humana. Estos residuos de aminoácido no humanos comúnmente son conocidos como residuos de "importación", los cuales se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización se puede llevar a cabo usando el método de Winter y colaboradores al sustituir CDRs de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un

anticuerpo humano (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al, Science 239:1534-1536 (1988); revisado en Clark, Immunol, Today 21:397-402 (2000)).

- 5 Un anticuerpo humanizado puede prepararse mediante un proceso de análisis de las secuencias progenitoras y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias progenitoras y humanizadas. Modelos de inmunoglobulina tridimensionales
- 10 están disponibles comercialmente y son familiares para los expertos en la técnica. Los programas de computadora están disponibles e ilustran y presentan visualmente estructuras de conformación tridimensional probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de
- 15 estas presentaciones visuales permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta
- 20 manera, se pueden seleccionar residuos FR y combinarse a partir de la secuencia de consenso e importación de tal forma que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad incrementada por los antígenos objetivo. En general, los residuos CDR son directa y muy sustancialmente
- 25 implicados en influenciar la unión a antígeno.

(iii) Fragmentos de Anticuerpo

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Estos fragmentos pueden producirse mediante células hospederas recombinantes (revisado en Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11:548-557 (1999); Little et al., Immunol Today 21:364-370 (2000)). Por ejemplo, fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Biotechnology 10:163-167 (1992)). En otra modalidad, el F(ab')₂ se forma usando la cremallera de leucina GCN4 para promover el ensamble de la molécula F(ab')₂. De acuerdo con otro enfoque, fragmentos Fv, Fab o F(ab')₂ pueden también aislarse directamente del cultivo de células hospederas recombinantes.

15

Ejemplo 18Blots de perfilador de proteomas de cinasa intracelular

Para identificar moléculas de señalización intracelular afectadas por tratamiento con AR40A746.2.3, lisados de células tratadas con AR40A746.2.3 se tamizaron usando una disposición de anticuerpos fosfo-MAPK humanos de perfilador de proteomas (ARY002, R&D Systems Inc. Minneapolis, MN).

25

Tratamiento y preparación de células

Trabajo previo demostró eficacia *in vivo* de

AR40A746.2.3 en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático usando células BxPC-3 que crecieron en ratones inmunodeficientes combinados severos (SCID). En consecuencia, el tamizado para la activación de moléculas de señalización intracelular se llevó a cabo usando líneas de células BxPC-3. Células BxPC-3 fueron cultivadas hasta casi confluencia, lavadas con solución salina de pH regulado con fosfato (PBS) y luego ayunadas en suero y medio deficiente de suplemento durante la noche a 37°C. Después de esto, se añadió AR40A746.2.3 (20 microgramos/ml) o 1B7.11 (IgG1) (20 microgramos/ml) a las células y se dejó unir durante 20 minutos a 4°C. Las células fueron después estimuladas al añadir suero bovino fetal (FBS, L-glutamina y piruvato de sodio a las células para dar una concentración final de 10 por ciento de FBS, 1 por ciento de L-glutamina y 1 por ciento de piruvato de sodio. Las células fueron puestas en una incubadora a 37°C y el lisado de células se recogió 1 hora después de la estimulación. Los lisados fueron recogidos al lavar las células dos veces con PBS y cosechar en regulador de pH de lisis 6 (Parte No. 895561: disposición de anticuerpos ARY002 de R&D Systems). Las células fueron resuspendidas por pipeteo, transferidas a un tubo microcentrífugo de 1.5 ml y mezcladas por rotación a 4°C durante 30 minutos. Los lisados fueron después centrifugados a 14,000 xg durante cinco minutos y el sobrenadante se

transfirió a un tubo limpio. La concentración de proteína se determinó mediante ensayo de proteína de ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL).

Disposición de anticuerpos fosfo-MAPK humanos

- 5 Una disposición de anticuerpos fosfo-MAPK humanos se tamizó con lisados de células BxPC-3 de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante (cuarta revisión, mayo de 2006, disposición de anticuerpos ARY002 de R&D Systems). Brevemente, cada membrana del perfilador fosfo-MAPK humano se
- 10 prepararon al incubar en 1.5 ml de regulador de pH de ensayo 1 (Parte No. 895477: disposición de anticuerpos ARY002 de R&D Systems) durante 1 hora en un agitador de plataforma oscilatoria. Para cada tratamiento, 200 microgramos de proteína total se diluyeron con regulador de pH de lisis 6
- 15 para dar un volumen final de 250 microlitros y se mezcló con 1.25 ml de regulador de pH de ensayo 1. Esta mezcla se añadió a las membranas perfiladoras preparadas y se incubó a 4°C durante la noche en un agitador de plataforma oscilatoria. Cada membrana se lavó después tres veces en regulador de pH
- 20 de lavado 1X (diluido en agua destilada purificada a partir de un abastecimiento de 25X, (Parte no. 895003: disposición de anticuerpos ARY002 de R&D Systems)) y se incubó durante 2 horas con 1.5 ml de coctel de anticuerpo de detección anti-fosfo-MAPK (que contenía anticuerpos fosfo-específicos
- 25 biotinilados) (Parte no. 893051: disposición de anticuerpos

ARY002 de R&D Systems) preparado en 1X de regulador de pH de
disposición 2/3 (regulador de pH de disposición 5X 2, parte
no. 895478: disposición de anticuerpos ARY002 de R&D Systems;
regulador de pH de disposición 3, parte no. 895008:
5 disposición de anticuerpos ARY002 de R&D Systems). Las
membranas se lavaron 3 veces en 1X de regulador de pH de
lavado y se incubaron durante 30 minutos con 1.5 ml de
Streptavidin-HRP (parte no. 890803: disposición de
anticuerpos ARY002 de R&D Systems) diluido 1:2000 en 1X de
10 regulador de pH 2/3. Las membranas se lavaron 3 veces en 1X
de regulador de pH de lavado y se expusieron a reactivos de
detección Western ECL plus (GE Healthcare, Life Sciences,
Piscataway, NJ) para revelado. Las membranas se expusieron a
película quimioluminiscente (Kodak, Cedex, Francia) y se
15 revelaron usando un procesador médico de rayos X. Los datos
de la disposición fosfo-MAPK en películas de rayos X
reveladas fueron cuantificados al escanear la película en un
escáner en modo de transmisión y analizar el archivo de
imagen de disposición usando software de análisis de imagen J
20 (Image J 1.37v, NIH). Para cada cinasa, la densidad de
píxeles promedio para puntos duplicados correspondientes se
calculó y se restó de la señal de fondo usando la densidad de
píxeles de un área transparente sobre la membrana. La
densidad de píxeles normalizada promedio de muestras tratadas
25 con AR40A746.2.3 se dividió entre la densidad de píxeles

normalizada promedio de muestras tratadas con 1B7.11 para cada objetivo de fosfo-proteína correspondiente para obtener una relación de cambio relativo. La reducción porcentual de la señal de fosfo-proteína se determinó al restar la relación de cambio relativo de 1 y multiplicar por 100.

Los resultados de las membranas de disposición fosfo-MAPK que muestran cambios en la intensidad de puntos como una reducción porcentual con AR40A746.2.3 se muestran en la figura 34. En comparación con 1B7.11, AR40A746.2.3 suprimió la fosforilación de cinasa S ribosómica de 0 kDa (Rsk) (46.2 por ciento), glicógeno sintasa cinasa 3 alfabeta (Gsk3 α / β 20.6 por ciento; Gsk3 β 51.0 por ciento)), Akt/proteína cinasa B (PKB) (Akt total Akt pan 21.6 por ciento), Akt1/PKBalfa (17.1 por ciento), Akt2/PKBbeta 43. Por ciento y Akt3/PKBgamma 49.0 por ciento)) y proteína de choque térmico (HSP) 27 (49.4 por ciento) en células BxPC-3 estimuladas con suero y suplementos. Estas cinasas están implicadas en vías de señalización intracelular que pueden afectar la proliferación celular, crecimiento y supervivencia. Que AR40A746.2.3 puede reducir la fosforilación de estas cinasas después de la estimulación por suero y complementos sugiere que AR40A746.2.3 podría bloquear crecimiento y supervivencia de células a través de estas cinasas y sus vías de señalización intracelular relacionadas. Por lo tanto, estos datos proporcionan direcciones

potenciales hacia mecanismos de entendimiento de la acción para AR40A746.2.3 a través de señalización intracelular y para identificar marcadores o indicadores nuevos para medir la actividad de AR40A746.2.3 y para selección de pacientes.

5

Ejemplo 19

Blots perfiladores de proteoma de tirosina cinasa receptora

Para identificar moléculas de señalización intracelular afectadas por tratamiento con AR40A746.2.3, 10 lisados de células tratadas con AR40A746.2.3 se tamizaron usando una disposición de anticuerpos fosfo-RTK humanos perfiladores proteómicos (ARY001, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN).

Tratamiento y preparación de células

15 Trabajo previo demostró eficacia *in vivo* de AR40A746.2.3 en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático usando células BxPC-3 cultivadas en ratones inmunodeficiente combinados severos (SCID). En consecuencia, el tamizado para la activación de moléculas de señalización 20 intracelular se llevó a cabo usando líneas de células BxPC-3. Células BxPC-3 fueron cultivadas hasta casi confluencia, lavadas con solución salina de pH regulado con fosfato (PBS) y luego ayunadas en suero en medios deficientes de complemento durante la noche a 37°C. Después de esto, 25 AR40A746.2.3 (20 microgramos/mL) o 1B7.11 (IgG1) (20

microgramos/mL) se añadieron a las células y se dejaron unir durante 20 minutos a 4°C. Las células fueron después estimuladas al añadir suero bobino fetal (FBS), L-glutamina y piruvato de sodio a las células para dar una concentración final de FBS, 1 por ciento de L-glutamina y 1 por ciento de piruvato de sodio. Las células se pusieron en una incubadora a 37°C y el lisado de células se recogió 15 minutos después de la estimulación. Los lisados se recogieron al lavar las células dos veces con PBS y cosechar en regulador de pH de lisis NP-40 (1 por ciento de NP-40, 20 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 137 mM de NaCl, 10 por ciento de glicerol, 2 mM de EDTA, 1 mM de ortovanadato de sodio, 10 microgramos/mL de Aprotinina, 10 microgramos/mL de Leupeptina). Las células fueron resuspendidas por pipeteo, transferidas a un tubo microcentrífugo de 1.5 mL y mezcladas por rotación a 4°C durante 30 minutos. Los lisados se centrifugaron a 14,000 xg durante cinco minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. La concentración de proteína se determinó mediante ensayo de proteínas de ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL).

Disposición de anticuerpos fosfo-RTK humanos

Una disposición de anticuerpos fosfo-RTK humanos se tamizó con lisados de células BxPC-3 de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante (disposición de anticuerpos ARY001 de R&D Systems). Brevemente, cada membrana

de perfiladora fosfo-RTK humana se preparó al incubar en 1.5 mL de regulador de pH de ensayo 1 (Parte No. 895477: disposición de anticuerpos ARY001 de R&D Systems) durante 1 hora en un agitador de plataforma oscilatoria. Para cada

5 tratamiento, un volumen que contenía 200 microgramos de proteína total se diluyó hasta 1.5 mL con regulador de pH de ensayo 1. Esta mezcla se añadió a las membranas perfiladoras preparadas e incubadas a 4°C durante la noche en un agitador de plataforma oscilatoria. Cada membrana se lavó después 3

10 veces en regulador de pH de lavado 1X (diluido en agua destilada purificada a partir de una solución de abastecimiento 25X, (Parte no. 895003: disposición de anticuerpos ARY001 de R&D Systems)) y se incubó durante 2 horas con 1.5 mL de un anticuerpo de detección anti-fosfo-

15 tirosina-HRP (Parte no. 841403: disposición de anticuerpos ARY001 de R&D Systems) preparado en 1X de regulador de pH de disposición 2 (5X de regulador de pH de disposición 2, parte no. 895478: disposición de anticuerpos ARY001 de R&D Systems). Las membranas se lavaron 3 veces en 1X de regulador

20 de pH de lavado y se expusieron a reactivos de detección Western ECL plus (GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, NJ) para revelado. Las membranas se expusieron a película quimioluminiscente (Kodak, Cedex, Francia) y se revelaron usando un procesador médico de rayos X. Los datos de la

25 disposición fosfo-RTK en películas de rayos X reveladas

fueron cuantificados al escanear la película en un escáner en modo de transmisión y analizar el archivo de imágenes de disposición usando software de análisis de imagen J (Image J 1.37v, NIH). Para cada RTK, la densidad de pixeles promedio para puntos duplicados correspondientes se calculó y se restó de la señal de fondo usando la densidad de pixeles de un área transparente sobre la membrana. La densidad de pixeles normalizada promedio de muestras tratadas con AR40A746.2.3 se dividió entre la densidad de pixeles normalizada promedio de muestras tratadas con 1B7.11 para cada objetivo de fosfo-proteína correspondiente para obtener una relación de cambio relativo. La reducción porcentual de la señal de fosfo-proteína se determinó al restar la relación de cambio relativo de 1 y multiplicar por 100.

Los resultados de las membranas de ensayo fosfo-RTK que muestran cambios en la intensidad de puntos como una reducción porcentual con AR40A746.2.3 se muestran en la figura 35. En comparación con 1B7.11, AR40A746.2.3 suprimió la fosforilación de ErbB3 (HER3) (28.3 por ciento), ErbB4 (HER4) (77.0 por ciento), receptores 1 y 3 de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (FGF R1 (59.5 por ciento), FGF R3 (84.7 por ciento)), receptor de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (MSP R) (39.5 por ciento), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Flt 3) (94.4 por ciento, c-RET (54.8 por ciento), Tie2/Tek (71.6

por ciento) y receptor 3 de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (VEGF R3) (53.7 por ciento) en células BxPC-3 estimuladas con suero y suplementos. Asimismo, el tratamiento con AR40A746.2.3 incrementó la fosforilación de

5 TrkA (31.6 por ciento) en relación al tratamiento con isotipo solo. Estas RTKs están implicadas en vías de señalización intracelular que pueden afectar proliferación, crecimiento y supervivencia de células. Que AR40A746.2.3 puede afectar la fosforilación de estas RTKs después de la

10 estimulación por suero y complementos sugiere que AR40A746.2.3 podría afectar el crecimiento de supervivencia celular a través de estas RTKs y sus vías de señalización intracelular relacionadas. Por lo tanto, estos datos proporcionan direcciones potenciales hacia el entendimiento

15 del mecanismo de acción para AR40A746.2.3 a través de señalización celular e identificación de marcadores o indicadores nuevos para medir la actividad de AR40A746.2.3 y para selección de pacientes.

20

Ejemplo 20

Tinción con anexina-V de células BxPC-3 que fueron tratadas con mAR40A746.2.3

La tinción con anexina-V se llevó a cabo para determinar si el anticuerpo murino AR40A746.2.3 era capaz de

25 inducir apoptosis en la línea de células de cáncer

pancreático humano BxPC-3. Células BxPC-3 fueron tratadas durante 24 y 40 horas con AR40A746.2.3 a 0.2, 2 y 20 microgramos/mL. Cada concentración de anticuerpos se probó por triplicado junto con control de isotipo
5 adecuado (1B7.11, anti-TNP, IgG1 de murino, kappa, producido en casa) probado a la concentración idéntica. Una muestra no tratada se incluyó como el control negativo y se incluyó campotecina (Biovision; Exton, PA) como el control positivo. El instrumento FACS se
10 compensó para salpicado óptico de los conjugados fluorescentes usando esferas fluorométricas (BD Bioscience, Oakville, ON). Las células fueron después teñidas con Anexina-V y 7AAD y adquiridas en una disposición FACS dentro de 1 hora. Los efectos
15 apoptóticos espontáneos de las células tratadas con control de isotipo se encontró que eran similares a células tratadas con vehículo únicamente. El anticuerpo AR40A746.2.3 de murino se encontró que inducía apoptosis en la línea de células de cáncer pancreático de una
20 manera dependiente de dosis en cada experimento, con un mayor efecto apoptótico visto a una concentración de 20 µg/mL, en donde 61.3% de las células apoptóticas totales se obtuvieron contra 36.1% obtenido en células tratadas con el control de isotipo (figura 36).

25

Ejemplo 21Una composición que comprende el anticuerpo de la presente
invención

El anticuerpo de la presente invención se puede
5 usar como una composición para prevenir/tratar cáncer. La
composición para prevenir/tratar cáncer, la cual comprende el
anticuerpo de la presente invención, puede administrarse como
tal en forma de preparaciones líquidas, o composiciones
farmacéuticas de preparaciones adecuadas a humanos o
10 mamíferos (por ejemplo, ratas, conejos, borregos, cerdos,
bovinos, felinos, caninos, simios, etc.) oral o
parenteralmente (por ejemplo, intravascularmente,
intraperitonealmente, subcutáneamente, etc.). El anticuerpo
de la presente invención puede administrarse por sí solo, o
15 se puede administrar como una composición adecuada. La
composición usada para la administración puede contener un
vehículo farmacológicamente aceptable con el anticuerpo de la
presente invención o su sal, un diluyente o excipiente. Esta
composición se proporciona en forma de preparaciones
20 farmacéuticas adecuadas para administración oral o
parenteral.

Ejemplos de la composición para administración
parenteral son preparaciones inyectables, supositorios, etc.
Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosis
25 tales como inyecciones intravenosas, subcutáneas,

intracutáneas e intramusculares, infusiones de goteo, inyecciones intra-articulares, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse mediante métodos conocidos públicamente. Por ejemplo, las preparaciones inyectables
5 pueden prepararse al disolver, suspender o emulsionar el anticuerpo de la presente invención o su sal en un medio acuoso estéril o un medio oleoso usado convencionalmente para inyecciones. Como el medio acuoso para inyecciones, están, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución
10 isotónica que contenga glucosa u otros agentes auxiliares, etc., la cual se puede usar en combinación con un agente de solubilización adecuado tal como un alcohol (por ejemplo etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un agente tensioactivo no iónico (por
15 ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (polioxietileno (50 moles) aducto de aceite de ricino hidrogenado)), etc. Como el medio oleoso, se emplea, por ejemplo, aceite de ajonjolí, aceite de soya, etc., los cuales se pueden usar en combinación con un agente de solubilización tal como benzoato de bencilo,
20 alcohol bencílico, etc. La inyección preparada de esta manera se rellena normalmente en una ampollita adecuada. El supositorio usado para administración rectal puede prepararse al mezclar el anticuerpo de la presente invención o su sal con bases para supositorios convencionales. La composición
25 para administración oral incluye preparaciones sólidas o

líquidas, específicamente tabletas (incluyendo grageas y tabletas recubiertas con película), píldoras, gránulos, preparaciones en polvo, cápsulas (incluyendo cápsulas suaves), jarabe, emulsiones, suspensiones, etc. Esa
5 composición se elabora mediante métodos conocidos públicamente y puede contener un vehículo, un diluyente o excipiente usado convencionalmente en el campo de preparaciones farmacéuticas. Ejemplos del vehículo excipiente para tabletas son lactosa, almidón, sucrosa, estearato de
10 magnesio, etc.

Adecuadamente, las composiciones para uso oral o parenteral descritas arriba se preparan en preparaciones farmacéuticas con una dosis única adecuada para ajustarse a una dosis de los ingredientes activos. Estas preparaciones de
15 dosis única incluyen, por ejemplo, tabletas, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampolletas), supositorios, etc. La cantidad de compuesto mencionado arriba contenida es generalmente de 5 a 500 mg por forma de unidad de dosis; se prefiere que el anticuerpo descrito arriba esté contenido en
20 aproximadamente 5 a alrededor de 100 mg especialmente en forma de inyección, y en 10 a 250 mg para otras formas.

La dosis del agente profiláctico/terapéutico mencionado arriba o regulador que comprende un anticuerpo de la presente invención puede variar dependiendo del sujeto que
25 será administrado, la enfermedad objetivo, condiciones, ruta

de administración, etc. Por ejemplo, cuando se usa con el propósito de tratar/prevenir, por ejemplo, cáncer de seno en un adulto, es adecuado administrar el anticuerpo de la presente invención intravenosamente en una dosis de alrededor
5 de 0.01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, de preferencia alrededor de 0.1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal y muy preferiblemente alrededor de 0.1 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 a 5 veces/día, de preferencia alrededor de 1 a 3 veces/día. En
10 otra administración parenteral y oral, el agente puede administrarse en una dosis que corresponda a la dosis arriba. Cuando la afección sea especialmente severa, la dosis puede ser incrementada de acuerdo con la afección.

El anticuerpo de la presente invención puede
15 administrarse como tal o en forma de una composición adecuada. La composición usada para la administración puede contener un vehículo farmacológicamente aceptable con el anticuerpo mencionado arriba o sus sales, un diluyente o excipiente. Esta composición es provista en forma de
20 preparaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral o parenteral (por ejemplo, inyección intravascular, inyección subcutánea, etc.). Cada composición descrita arriba puede contener además otros ingredientes activos. Además, el anticuerpo de la presente invención puede usarse en
25 combinación con otros fármacos, por ejemplo, agentes

alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, etc.), antagonistas metabólicos (por ejemplo, metotrexato, 5-fluorouracilo, etc.), antibióticos anti-tumorales (por ejemplo, mitomicina, adriamicina, etc.), agentes

5 antitumorales derivados de plantas (por ejemplo, vincristina, vindesina, taxol, etc.), cisplatino, carboplatino, etopósido, irinotecano, etc. El anticuerpo de la presente invención y los fármacos descritos arriba pueden administrarse simultáneamente o en momentos escalonados al paciente.

10 El método de tratamiento descrito en la presente, particularmente para cánceres, también se puede llevar a cabo con la administración de otros anticuerpos o agentes quimioterapéuticos. Por ejemplo, un anticuerpo contra EGFR, tal como ERBITUX® (cetuximab), también se puede administrar,

15 particularmente cuando se trata cáncer de colon. ERBITUX® también ha mostrado ser efectivo para el tratamiento de psoriasis. Otros anticuerpos para uso en combinación incluyen Herceptin® (trastuzumab) particularmente cuando se trata cáncer de seno, AVASTIN® particularmente cuando se trata

20 cáncer de colon y SGN-15 particularmente cuando se trata cáncer pulmonar no microcítico. La administración del anticuerpo de la presente invención con otros anticuerpos/agentes terapéuticos puede ocurrir simultáneamente, o por separado, mediante la misma o

25 diferente ruta.

El agente quimioterapéutico/otros regimenes de anticuerpos utilizados incluyen cualquier régimen que se crea sea óptimamente adecuado para el tratamiento de la afección del paciente. Las malignidades diferentes pueden requerir uso
5 de anticuerpos antitumor específicos y agentes quimioterapéuticos específicos, los cuales se determinarán sobre una base de paciente a paciente. En una modalidad preferida de la invención, se administra quimioterapia junto con, o, más preferiblemente, después de la terapia con
10 anticuerpo. Sin embargo, se debe enfatizar que la presente invención no está limitada a ningún método o ruta de administración particular.

La preponderancia de evidencia muestra que AR40A746.2.3 media efectos anticáncer y prolonga la
15 supervivencia a través de la ligación de epítopos presentes en CD9. Se ha mostrado previamente (como se describe en el ejemplo 13) que los anticuerpos AR40A746.2.3 pueden usarse para inmunoprecipitar el antígeno cognado de células de expresión tales como células MDA-MB-231. Además puede
20 mostrarse que AR40A746.2.3, AR40A746.2.3 quimérico o variantes humanizadas pueden usarse en la detección de células y/o tejidos que expresen una porción antigénica CD9 que se une específicamente a los mismos, utilizando técnicas ilustradas por, pero no limitadas a FACS, ELISA de células o
25 IHC.

Al igual que con el anticuerpo AR40A746.2.3, otros anticuerpos anti-CD9 podrían usarse para inmunoprecipitar y aislar otras formas del antígeno CD9, y el antígeno puede usarse también para inhibir la unión de esos anticuerpos a las células o tejidos que expresen el antígeno usando los mismos tipos de ensayos.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta descripción son indicadoras de los niveles de aquellos capacitados en la técnica a la cual pertenece la invención.

10 Todas las patentes y publicaciones se incorporan en la presente a manera de referencia al mismo grado que si cada publicación individual estuviera específica e individualmente indicada como incorporada a manera de referencia.

Se debe entender que aunque cierta forma de la invención se ilustre, no se debe limitar a la forma o disposición específica o partes en la presente descritas y mostradas. Será aparente para aquellos expertos en la técnica que pueden hacerse varios cambios sin alejarse del alcance de la invención y que la invención no debe considerarse limitada a lo que se muestra y describe en la descripción.

Alguien capacitado en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como aquellos inherentes a la misma.

25 Cualquier oligonucleótido, péptido, polipéptido, compuesto

biológicamente relacionado, método, procedimiento y técnica descrito en la presente es actualmente representativo de las modalidades preferidas, se intenta que sea ejemplar y no se intenta como limitación del alcance. Los cambios en los

5 mismos y otros usos ocurrirán para aquellos expertos en la técnica que estén abarcados dentro del espíritu de la invención y sean definidos por el alcance de las reivindicaciones anexas. Aunque la invención ha sido descrita en relación con varias modalidades específicas preferidas,

10 debe entenderse que la invención reclamada no debe limitarse indebidamente a estas modalidades específicas. De hecho, varias modificaciones a los modos descritos para llevar a cabo la invención que sean obvias para aquellos expertos en la técnica se intenta que estén dentro del alcance de las

15 siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. El anticuerpo monoclonal aislado caracterizado porque es producido por el hibridoma depositado en la IDAC
5 con el número de registro 141204-01.

2. Un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado, caracterizado porque es producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un fragmento de unión a antígeno producido del
10 anticuerpo humanizado.

3. Un anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado, caracterizado porque es producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un fragmento de unión a antígeno producido del
15 anticuerpo quimérico.

4. La línea de células de hibridoma aislado, caracterizada porque es depositada en la IDAC con el número de registro 141204-01.

5. Un método para iniciar citotoxicidad inducida
20 por anticuerpos de células cancerosas en una muestra de tejido seleccionada de un tumor humano de próstata, seno o páncreas, caracterizado porque comprende:

proporcionar una muestra tisular del tumor humano de próstata, seno o páncreas;

25 proporcionar el anticuerpo monoclonal aislado

- producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01, el anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01, el
- 5 anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un CDMAB de los mismos, CDMAB con una capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno objetivo, y
- 10 poner en contacto el anticuerpo monoclonal aislado, el anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico o CDMAB del mismo con la muestra tisular;
- en donde la unión del anticuerpo monoclonal aislado, el anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico o
- 15 CDMAB de los mismos con la muestra tisular induce citotoxicidad.
6. Un CDMAB caracterizado porque es del anticuerpo monoclonal aislado de conformidad con la reivindicación 1.
7. Un CDMAB caracterizado porque es del anticuerpo
- 20 humanizado de conformidad con la reivindicación 2.
8. Un CDMAB caracterizado porque es del anticuerpo quimérico de conformidad con la reivindicación 3.
9. El anticuerpo aislado o su CDMAB de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 6, 7 u 8,
- 25 caracterizado porque es conjugado con un miembro seleccionado

del grupo que consiste en porciones citotóxicas, enzimas, compuestos radioactivos y células hematógenas.

10. Un método de reducción de un tumor humano de próstata, seno o páncreas en un mamífero, en donde el tumor humano de próstata, seno o páncreas expresa al menos un epítipo de un antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal aislado codificado por un clon depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un CDMAB del mismo, CDMAB que tiene una capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno objetivo, caracterizado porque comprende administrar al mamífero el anticuerpo monoclonal o CDMAB del mismo en una cantidad efectiva para dar como resultado una reducción de la carga tumoral de próstata, seno o páncreas del mamífero.

11. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es conjugado a una porción citotóxica.

12. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la porción citotóxica es un isótopo radioactivo.

13. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo activa complemento.

14. El método de conformidad con la reivindicación

10, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo media citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

15 15. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un fragmento de unión a antígeno producido del anticuerpo humanizado.

10 16. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un fragmento de unión a
15 antígeno producido del anticuerpo quimérico.

17. Un método de reducción de un tumor humano de próstata, seno o páncreas susceptible a citotoxicidad celular inducida por anticuerpos en un mamífero, en donde el tumor humano de próstata, seno o páncreas expresa al menos un
20 epítipo de un antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal aislado codificado por un clon depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un CDMAB del mismo, el CDMAB tiene una capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a
25 su antígeno objetivo, caracterizado porque comprende

administrar al mamífero el anticuerpo monoclonal o el CDMAB del mismo en una cantidad efectiva para dar como resultado una reducción de la carga tumoral de próstata, seno o páncreas del mamífero.

5 18. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es conjugado a una porción citotóxica.

10 19. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la porción citotóxica es un isótopo radioactivo.

20. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo activa complemento.

15 21. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo media citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

20 22. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un fragmento de unión a antígeno producido del anticuerpo humanizado.

25 23. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es

un anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un fragmento de unión a antígeno producido a partir del anticuerpo quimérico.

- 5 24. Un método de reducción de un tumor humano de próstata, seno o páncreas en un mamífero, en donde el tumor humano de próstata, seno o páncreas expresa al menos un epítipo de un antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma
- 10 depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un CDMAB del mismo, CDMAB que tiene una capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno objetivo, caracterizado porque comprende administrar al mamífero el anticuerpo monoclonal o
- 15 CDMAB del mismo en conjunto con al menos un agente quimioterapéutico en una cantidad efectiva para dar como resultado una reducción de la carga tumoral de próstata, seno o páncreas del mamífero.

- 20 25. El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado está conjugado a una porción citotóxica.

26. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la porción citotóxica es un isótopo radioactivo.

- 25 27. El método de conformidad con la reivindicación

24, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo activa complemento.

28. El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado o
5 CDMAB del mismo media citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

29. El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado
10 producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un fragmento de unión a antígeno producido del anticuerpo humanizado.

30. El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es
15 un anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un fragmento de unión a antígeno producido del anticuerpo quimérico.

31. Uso de anticuerpos monoclonales para la
20 reducción de carga tumoral de próstata, seno o páncreas en humanos, en donde el tumor humano de próstata, seno o páncreas expresa al menos un epítipo de un antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el
25 número de registro 141204-01 o un CDMAB del mismo, el CDMAB

tiene una capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno objetivo, que comprende administrar al mamífero el anticuerpo monoclonal o CDMAB del mismo en una cantidad efectiva para dar como
5 resultado una reducción de la carga tumoral de próstata, seno o páncreas del mamífero.

32. El método de conformidad con la reivindicación 31, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es conjugado a una porción citotóxica.

10 33. El método de conformidad con la reivindicación 32, en donde la porción citotóxica es un isótopo radioactivo.

34. El método de conformidad con la reivindicación 31, en donde el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo activa complemento.

15 35. El método de conformidad con la reivindicación 31, en donde el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo media citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

36. El método de conformidad con la reivindicación 31, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es un
20 anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01.

37. El método de conformidad con la reivindicación 31, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es un
25 anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado

producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01.

38. Uso de anticuerpos monoclonales para la reducción de carga tumoral de próstata, seno o páncreas en humanos, en donde el tumor humano de próstata, seno o páncreas expresa al menos un epítipo de un antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un CDMAB del mismo, el CDMAB tiene una capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno objetivo, que comprende administrar al mamífero el anticuerpo monoclonal o CDMAB del mismo; en conjunto con al menos un agente quimioterapéutico en una cantidad efectiva para dar como resultado una reducción de la carga de tumor humano de próstata, seno o páncreas del mamífero.

39. El método de conformidad con la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es conjugado a una porción citotóxica.

40. El método de conformidad con la reivindicación 39, en donde la porción citotóxica es un isótopo radioactivo.

41. El método de conformidad con la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo activa complemento.

42. El método de conformidad con la reivindicación

38, en donde el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo media citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

43. El método de conformidad con la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es un
5 anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01.

44. El método de conformidad con la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es un
10 anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01.

45. Un proceso para la reducción de un tumor humano de próstata, seno o páncreas que expresa al menos un epítipo de antígeno CD9 humano al que se une específicamente el
15 anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene número de registro IDAC 141204-01, caracterizado porque comprende:

administrar a un individuo que sufra del tumor
20 humano, al menos un anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo que se una al mismo epítipo o epítopos que aquellos a los que se une el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01;

25 en donde la unión del epítipo o epítopos da como

resultado una reducción de la carga tumoral de próstata, seno o páncreas.

46. Un proceso para la reducción de un tumor de próstata, seno o páncreas en un humano que exprese al menos
5 un epítipo de antígeno CD9 humano al que se une específicamente el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01, caracterizado porque comprende:

10 administrar a un individuo que sufra del tumor humano, al menos un anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo, que se una al mismo epítipo o epítipos que aquellos a los que se une el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el
15 número de registro IDAC 141204-01 en conjunto con al menos un agente quimioterapéutico;

en donde la administración da como resultado una reducción de la carga tumoral de próstata, seno o páncreas.

47. Un ensayo de unión para determinar una
20 presencia de células cancerosas en una muestra de tejido seleccionada de un tumor humano, a las que se une específicamente el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01, el anticuerpo
25 humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el

hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o el anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01, caracterizado porque

5 comprende:

proporcionar una muestra de tejido del tumor humano;

proporcionar al menos uno del anticuerpo monoclonal aislado, el anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico o
10 CDMAB de los mismos que reconozca el mismo epítipo o epítopos que aquellos reconocidos por el anticuerpo monoclonal aislado producido por una línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01;

poner en contacto al menos uno de los anticuerpos
15 proporcionados o CDMAB del mismo con la muestra de tejido, y determinar la unión del por lo menos un anticuerpo proporcionado o CDMAB del mismo con la muestra de tejido;

con lo cual se indica la presencia de las células cancerosas en la muestra de tejido.

20 48. Un ensayo de unión para determinar la presencia de células que expresan CD9 que es reconocido específicamente por el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01, el anticuerpo humanizado del
25 anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma

depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o el anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01, caracterizado porque comprende:

- 5 proporcionar una muestra de células;
 proporcionar el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01, el anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico o CDMAB de los mismos;
- 10 poner en contacto el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de unión a antígeno con la muestra de células y
 determinar la unión del anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo con la muestra de células;
- 15 con lo cual se determina la presencia de células que expresan un antígeno de CD9 al que se une específicamente el anticuerpo monoclonal aislado o el CDMBA del mismo.

49. Un ensayo de unión para determinar la presencia de células de primate que expresan CD9 que es reconocido
- 20 específicamente por el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01, el anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro
 - 25 141204-01 o el anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal

aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01, caracterizado porque comprende:

- proporcionar una muestra de células de primate;
- 5 proporcionar el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01, el anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico o CDMAB de los mismos;
- poner en contacto el anticuerpo monoclonal aislado
- 10 o el fragmento de unión a antígeno con la muestra de células de primate, y
- determinar la unión del anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo con la muestra de células de primate;
- 15 con lo cual se determina la presencia de células de primate que expresan un antígeno de CD9 al que se une específicamente el anticuerpo monoclonal aislado o el CDMA del mismo.

- 50. Un ensayo de unión para determinar la presencia
- 20 de células de conejo que expresan CD9 que es reconocido específicamente por el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01, el anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el
- 25 hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro

141204-01 o el anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01, caracterizado porque comprende:

5 proporcionar una muestra de células de conejo;
 proporcionar el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01, el anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico o CDMAB de los mismos;

10 poner en contacto el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de unión a antígeno con la muestra de células de conejo, y

 determinar la unión del anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo con la muestra de células de
15 conejo;

 con lo cual se determina la presencia de células de conejo que expresan un antígeno de CD9 al que se une específicamente el anticuerpo monoclonal aislado o el CDMA del mismo.

20 51. Un anticuerpo monoclonal caracterizado porque se une específicamente al mismo epítipo o epítomos que el anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01.

 52. Un anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del
25 mismo, caracterizado porque se une específicamente a CD9

humano, en el cual el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo reacciona con el mismo epítipo o epítopos de CD9 humano que el anticuerpo monoclonal aislado producido por una línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el
5 número de registro IDAC 141204-01; el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo, tiene una capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno CD9 humano objetivo.

53. Un anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del
10 mismo, caracterizado porque reconoce el mismo epítipo o epítopos que aquellos reconocidos por el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01; el anticuerpo monoclonal o CDMAB del mismo tiene
15 una capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su epítipo o epítopos objetivo.

54. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente al mismo epítipo o epítopos de CD9 humano que
20 el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01, caracterizado porque comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región de
25 determinación de complementariedad de SEQ ID NO: 1, SEQ ID

NO: 2 y SEQ ID NO: 3; y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de la región de determinación de complementariedad de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6;

5 o un fragmento de unión a CD9 humano de los mismos.

55. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al mismo epítipo o epítopos de CD9 humano que el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de
10 registro IDAC 141204-01, caracterizado porque comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región de determinación de complementariedad de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; y una región variable de la cadena
15 ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de región de determinación de complementariedad de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6; y regiones estructurales de dominio variable de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo humano o estructura de consenso de anticuerpo humano;

20 o un fragmento de unión a CD9 humano de los mismos.

56. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CD9 humano, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID No: 7; y
25 una secuencia de aminoácidos de la región variable de la

cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO: 8;

o un fragmento de unión a CD9 humano de los mismos.

57. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente al mismo epítipo o epítopos de CD9 humano que el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01, caracterizado porque comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región de determinación de complementariedad de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de región de determinación de complementariedad de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6;

o un fragmento de unión a CD9 humano de los mismos.

58. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente al mismo epítipo o epítopos de CD9 humano que el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR40A746.2.3 que tiene el número de registro IDAC 141204-01, caracterizado porque comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región de determinación de complementariedad de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de región

de determinación de complementariedad de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6; y regiones estructurales de dominio variable de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo humano o estructura de consenso de anticuerpo humano;

5 o un fragmento de unión a CD9 humano de los mismos.

59. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente a CD9 humano, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID No: 7; y
10 una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO: 8;

o un fragmento de unión a CD9 humano del mismo.

60. Una composición efectiva para tratar un tumor pancreático, de próstata, ovárico, de seno o colon humano,
15 caracterizada porque comprende en combinación:

el anticuerpo o CDMAB de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 6, 7, 8, 17, 49, 50, 54, 55 ó 56;

un conjugado de anticuerpo o un fragmento de unión
20 a antígeno del mismo con un miembro seleccionado del grupo que consiste en porciones citotóxicas, enzimas, compuestos radioactivos, citocinas, interferones, porciones objetivo o reporteras y células hematógenas; y

una cantidad necesaria de un vehiculo
25 farmacológicamente aceptable;

en donde la composición es efectiva para tratar el tumor humano de próstata, seno o páncreas.

61. Una composición efectiva para tratar un tumor humano de próstata, seno o páncreas, caracterizada porque
5 comprende en combinación:

el anticuerpo o CDMAB de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 6, 7, 8, 17, 49, 50, 54, 55 ó 56;

y una cantidad necesaria de un vehículo
10 farmacológicamente aceptable;

en donde la composición es efectiva para tratar el tumor humano de próstata, seno o páncreas.

62. Una composición efectiva para tratar un tumor humano de próstata, seno o páncreas, caracterizada porque
15 comprende en combinación:

un conjugado del anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o CDMAB de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 6, 7, 8, 17, 49, 50, 54, 55 ó 56, con un miembro seleccionado del grupo que consiste en
20 porciones citotóxicas, enzimas, compuestos radioactivos, citocinas, interferones, porciones objetivo o reporteras y células hematógenas; y

una cantidad necesaria de un vehículo farmacológicamente aceptable;

25 en donde la composición es efectiva para tratar el

tumor humano de próstata, seno o páncreas.

63. Un kit de ensayo para detectar la presencia de un tumor canceroso humano, en donde el tumor canceroso humano expresa al menos un epítipo de un antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC como número de registro 141204-01 o un CDMAB del mismo, el CDMAB tiene una capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno objetivo, el kit se caracteriza porque comprende el anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141204-01 o un CDMAB del mismo, y medios para detectar si el anticuerpo monoclonal, o un CDMAB del mismo, se une a un polipéptido cuya presencia, a un nivel límite particular, es diagnóstico de la presencia del tumor canceroso humano.

FIGURA 1

	ELISA secretora			Citotoxicidad						Unión de IgG					
	Veces			PC-3		LnCap		CCD-27sk		PC-3		LnCap		CCD-27sk	
	IgG	IgM		Promedio	CV	Promedio	CV	Promedio	CV	Veces		Veces		Veces	
	46.8	1.0		-19	0	8	11	3	13	1.5		5.4		0.7	
	AR40A746.2.3			110	-9	68	11	28	4						
Controles	NaN ₃			14	15	56	7	57	22						
	Cicloheximida														

113A

FIGURA 3

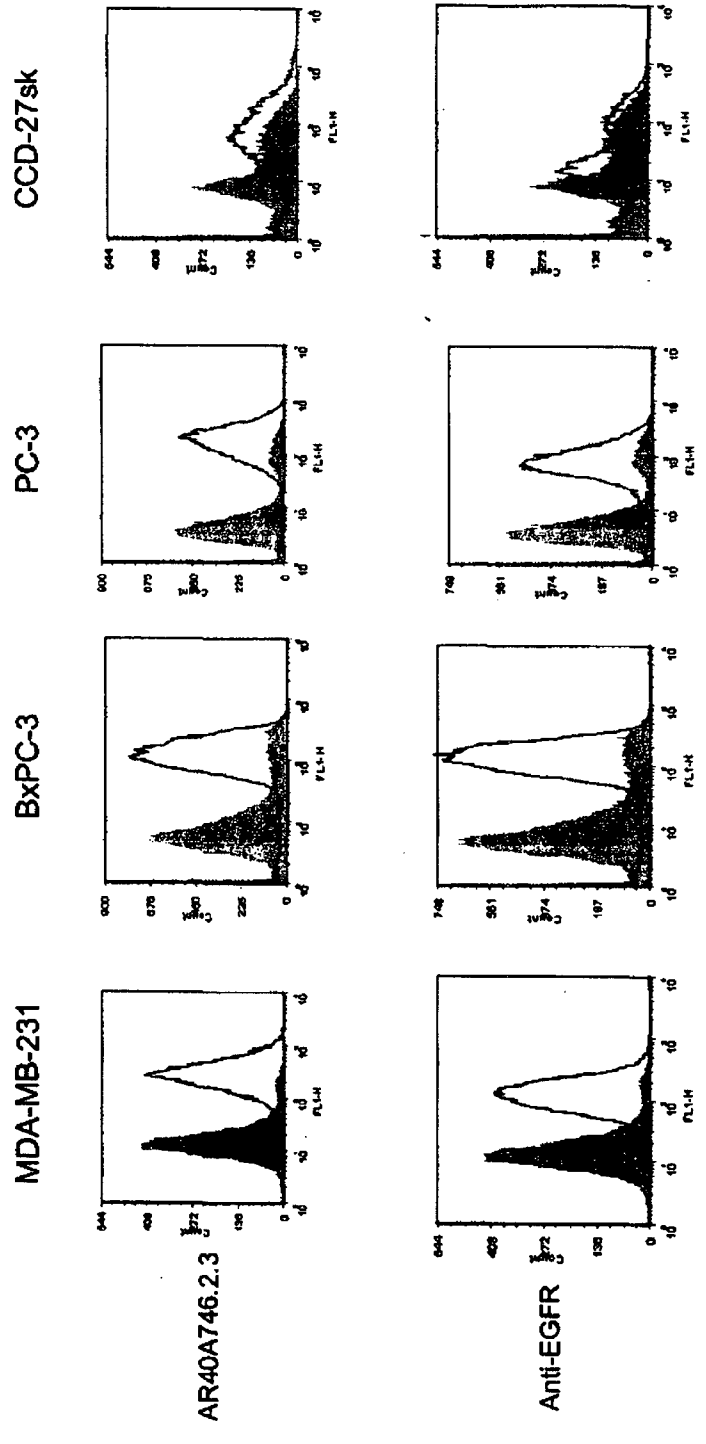
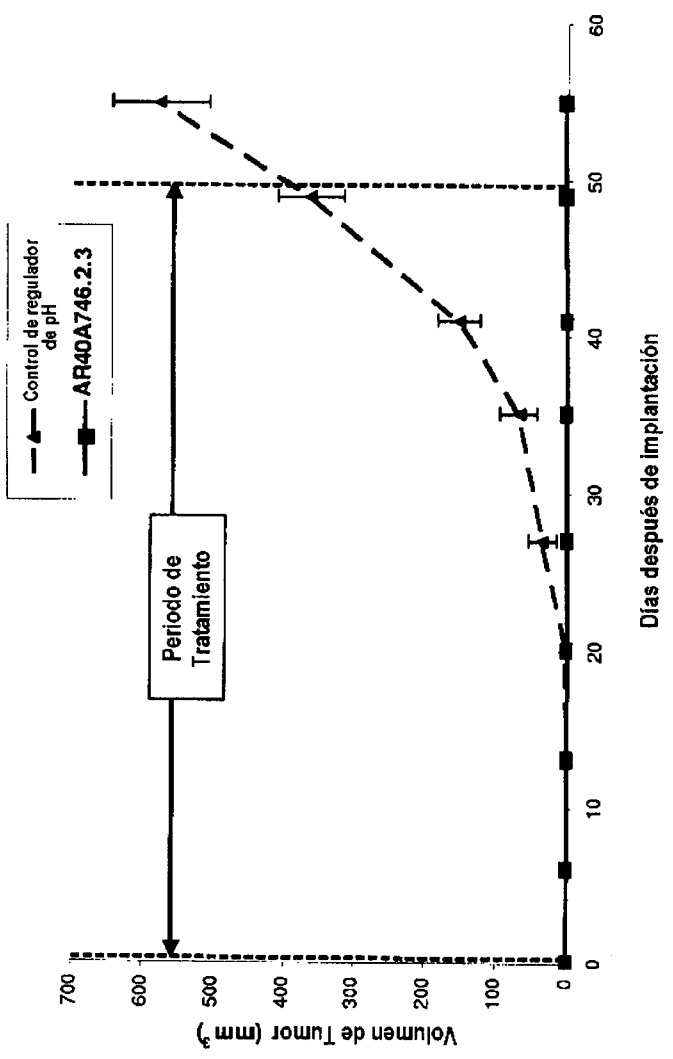


FIGURA 4



5/39

FIGURA 5

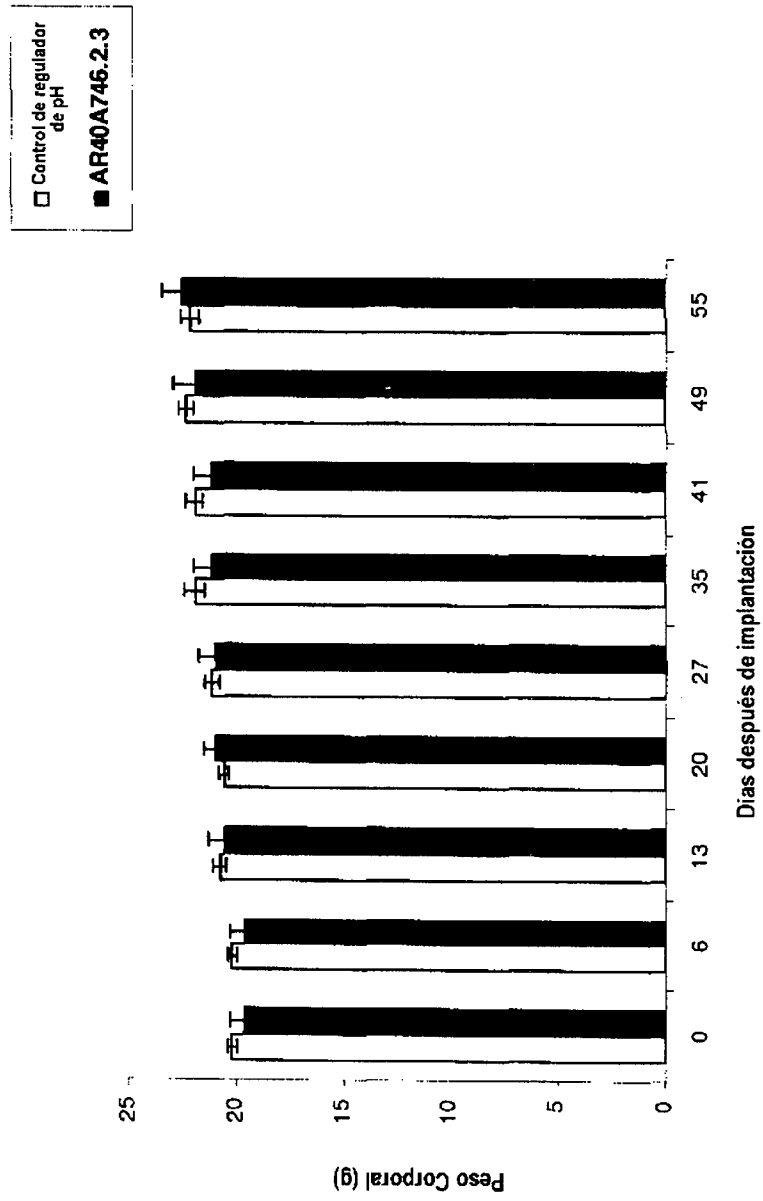


FIGURA 6

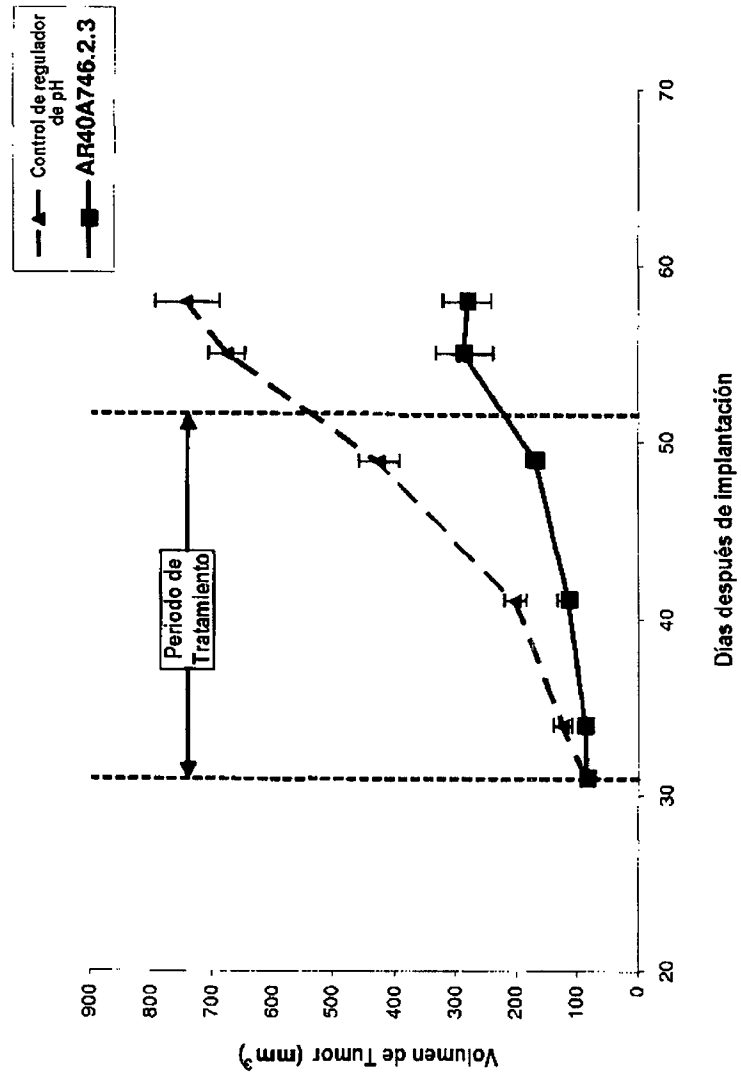


FIGURA 7

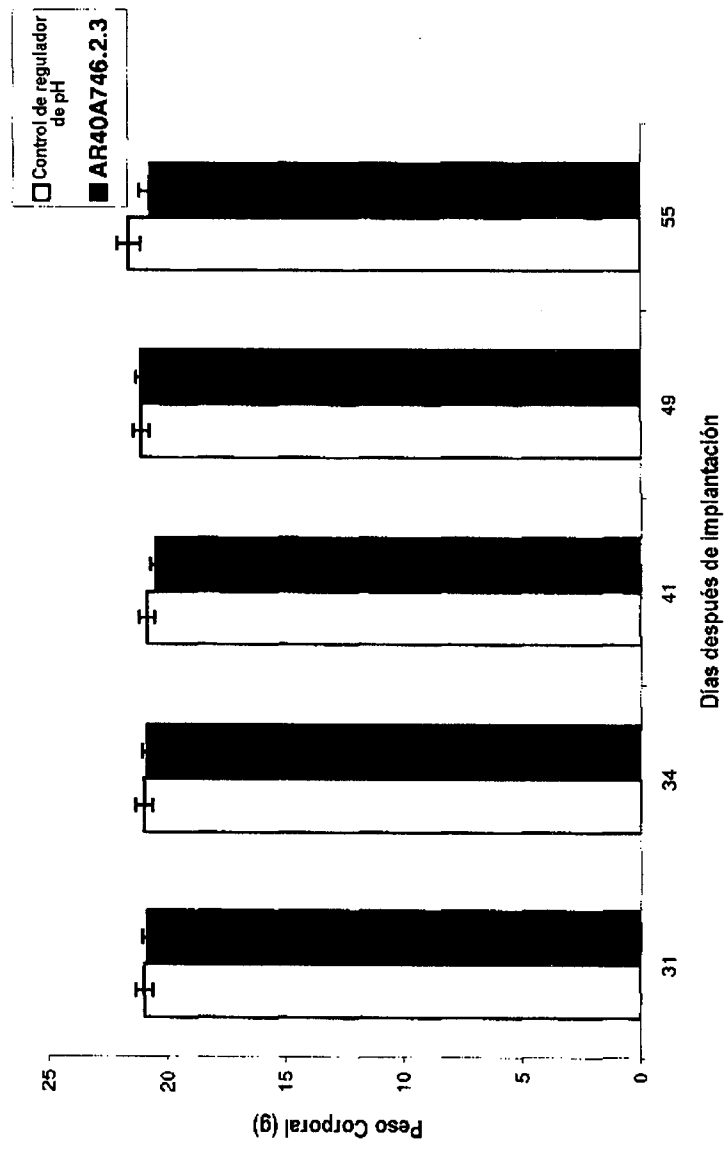
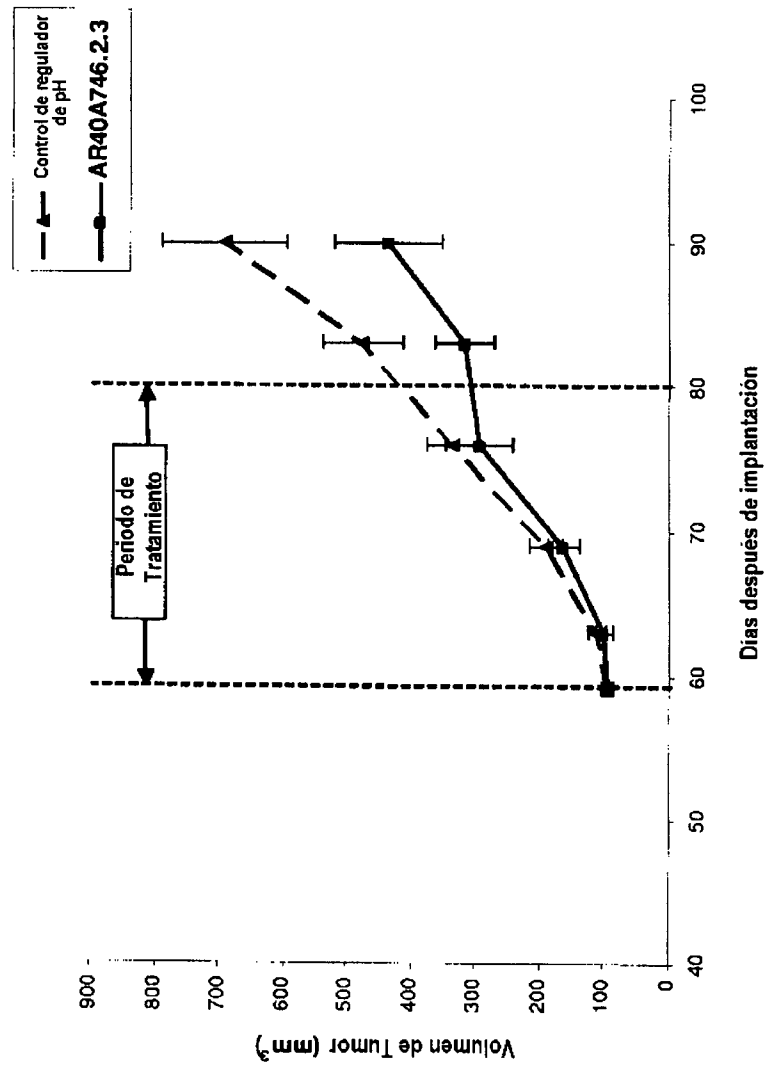


FIGURA 8



9/39

FIGURA 9

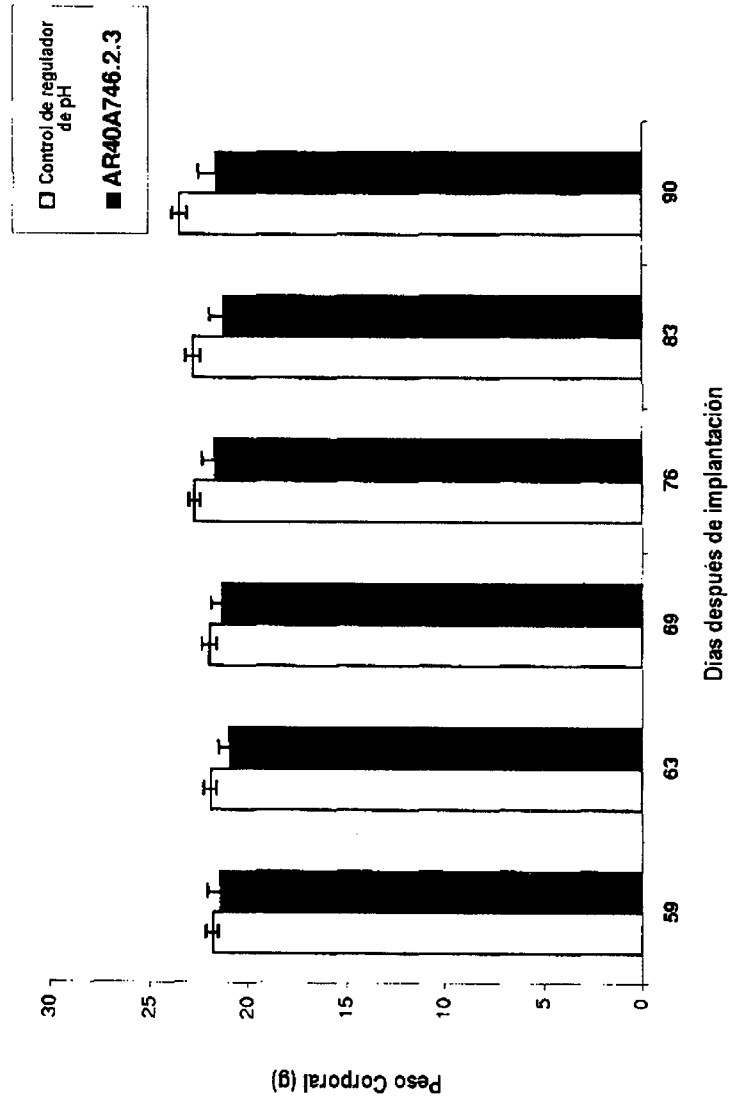


FIGURA 10

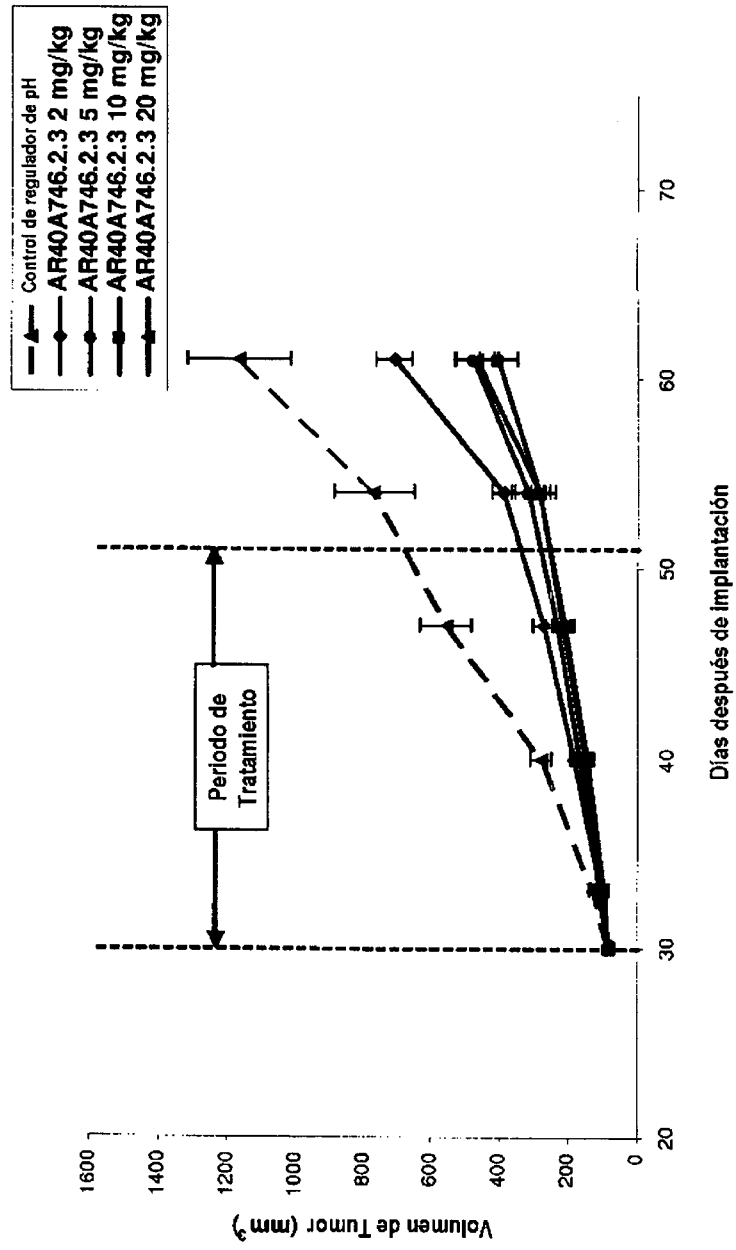
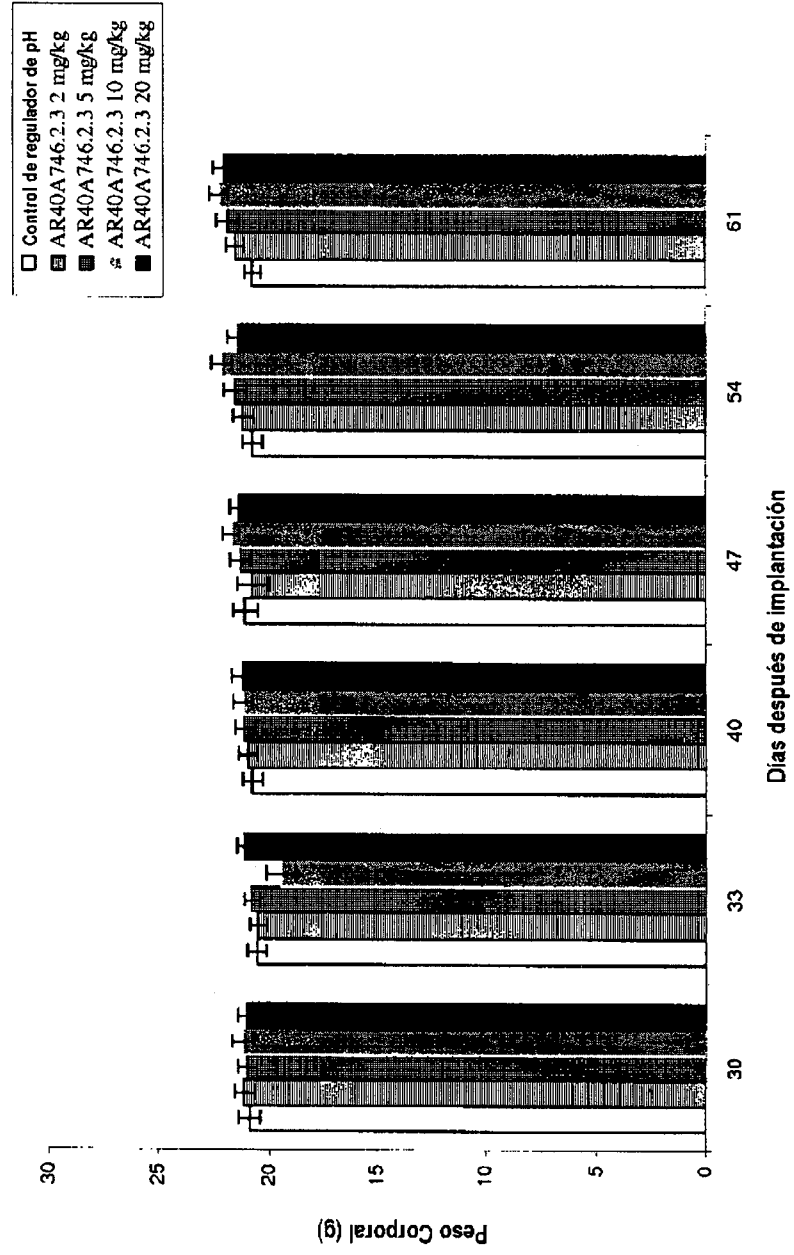


FIGURA 11



11/39

FIGURA 12

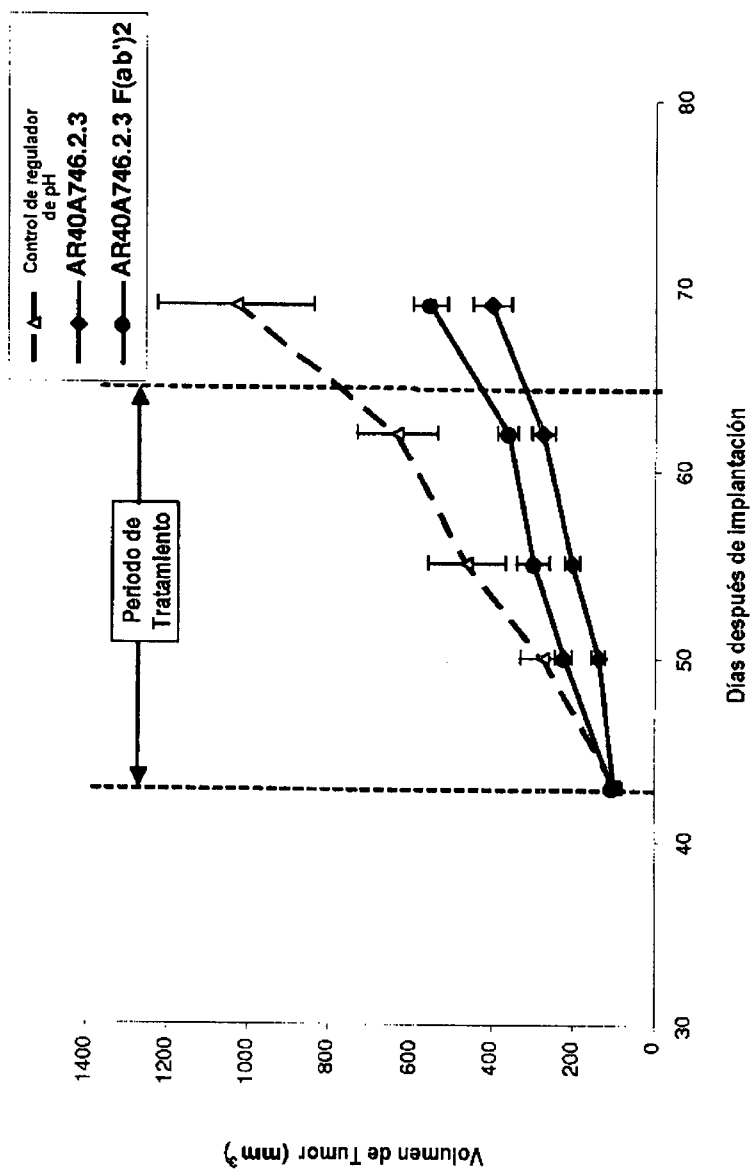


FIGURA 13

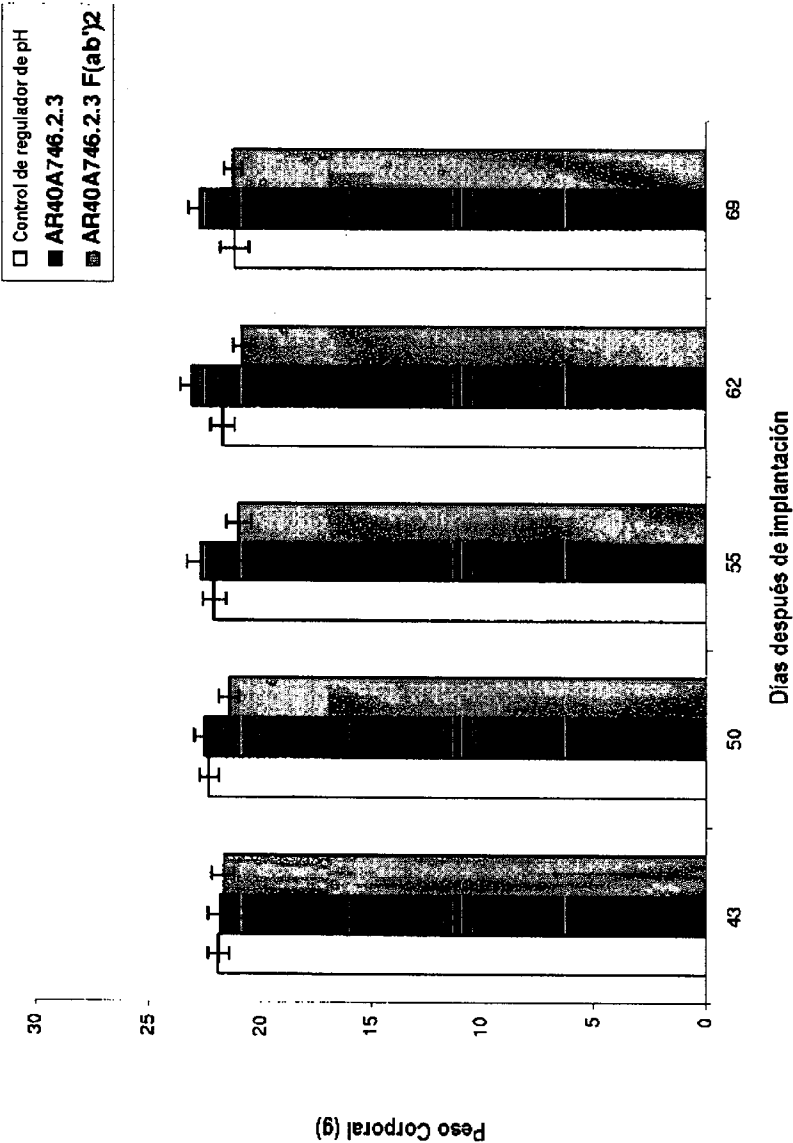
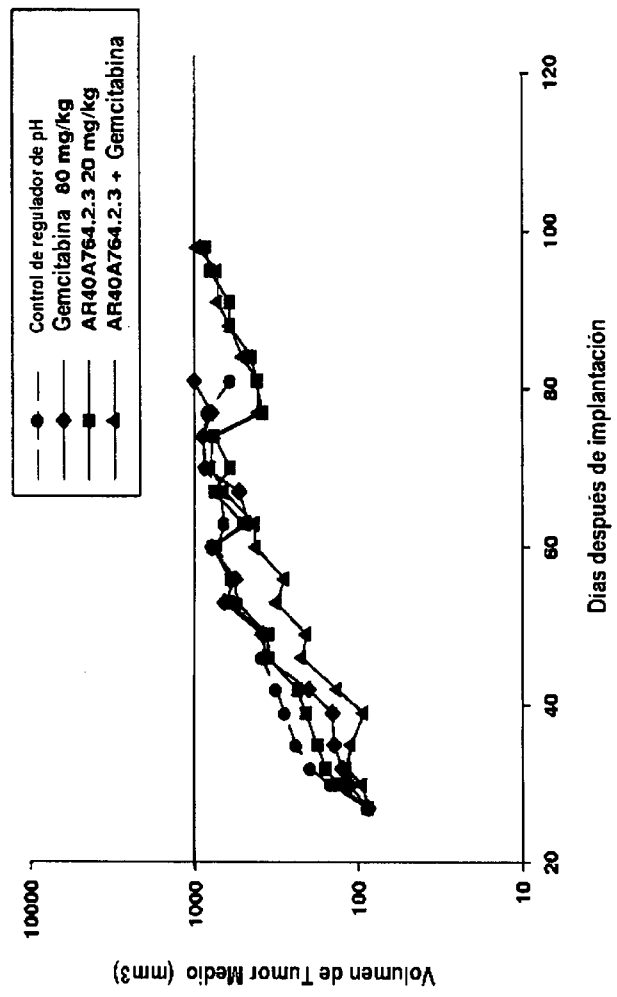


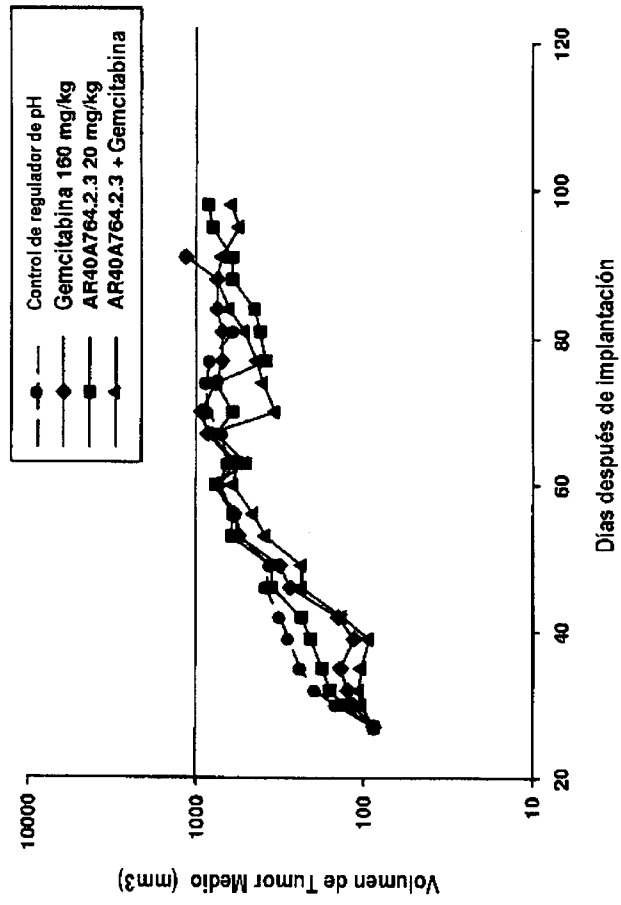
FIGURA 14



14 / 39

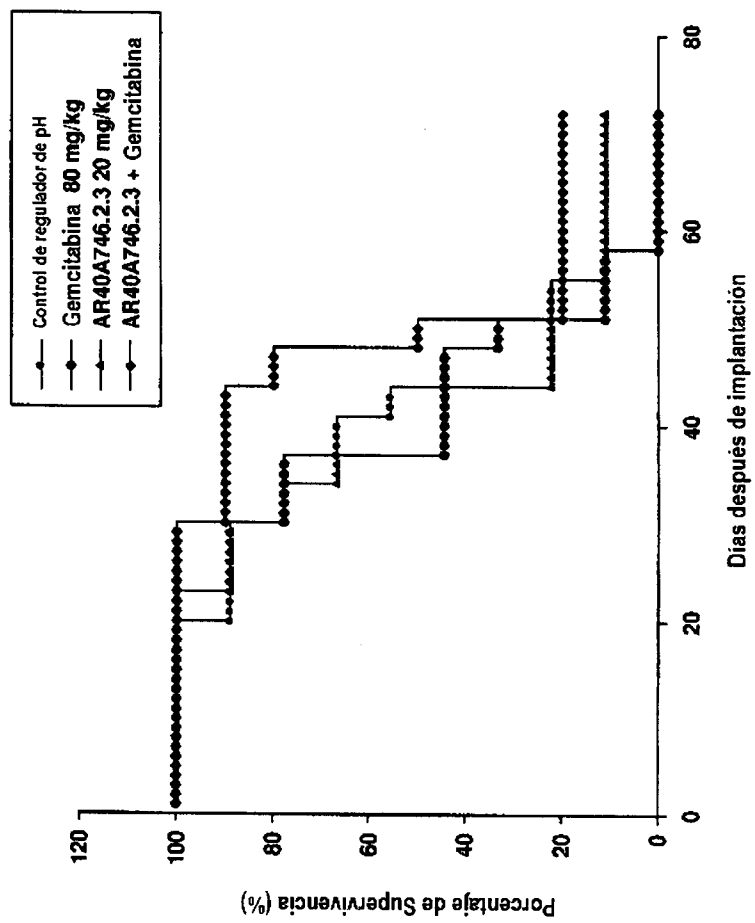
15/39

FIGURA 15



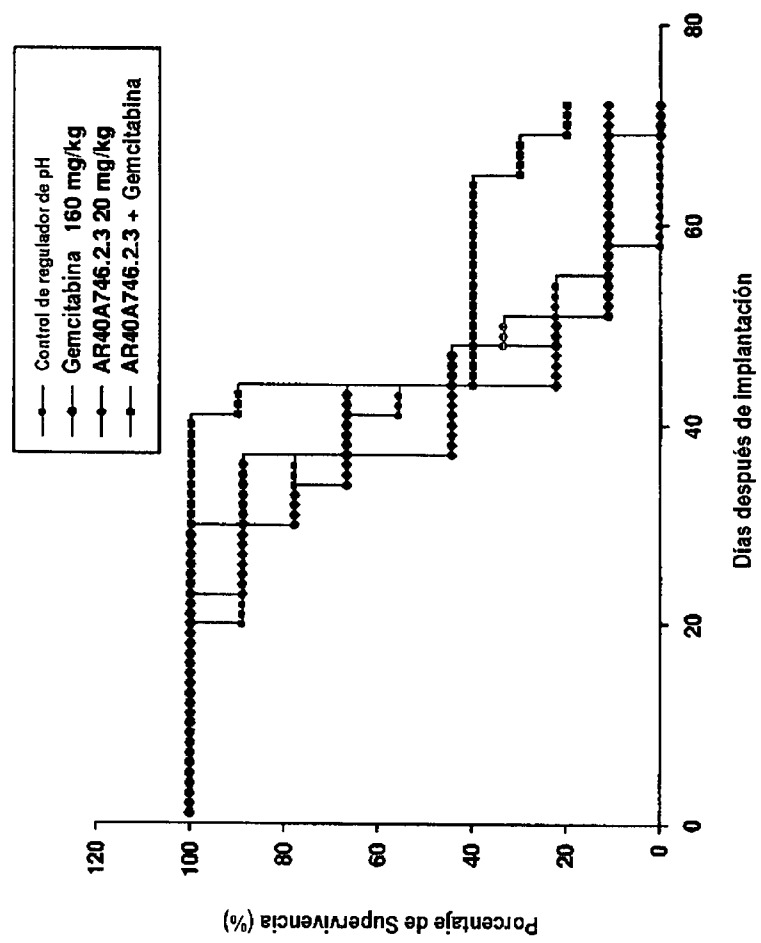
16/39

FIGURA 16



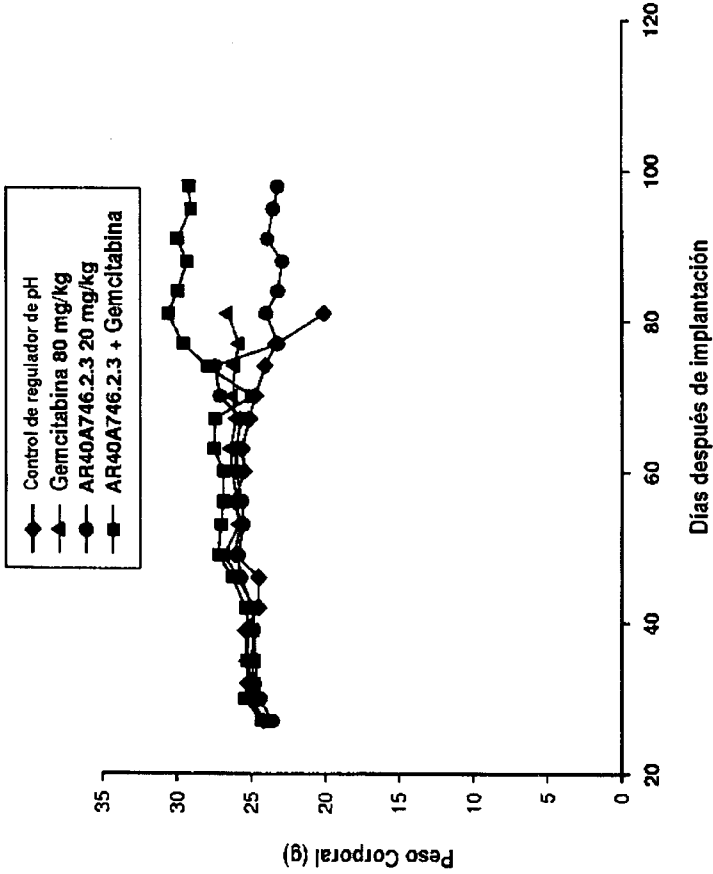
17 | 39

FIGURA 17



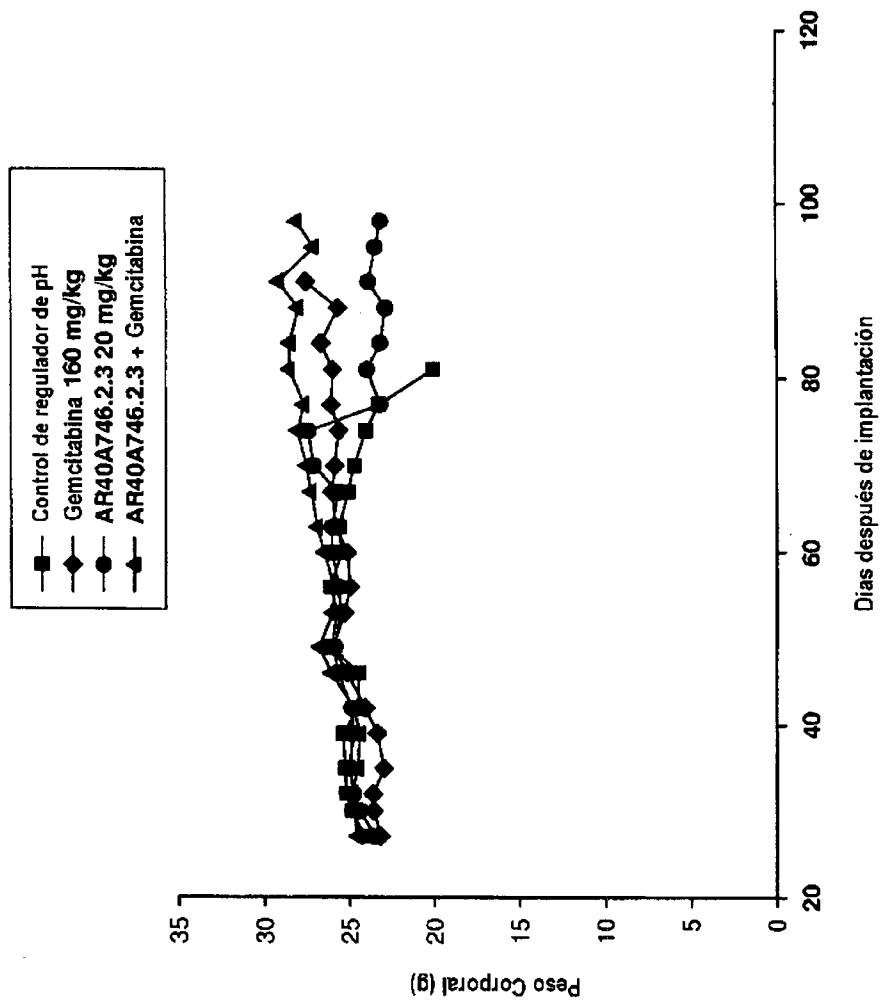
18/39

FIGURA 18



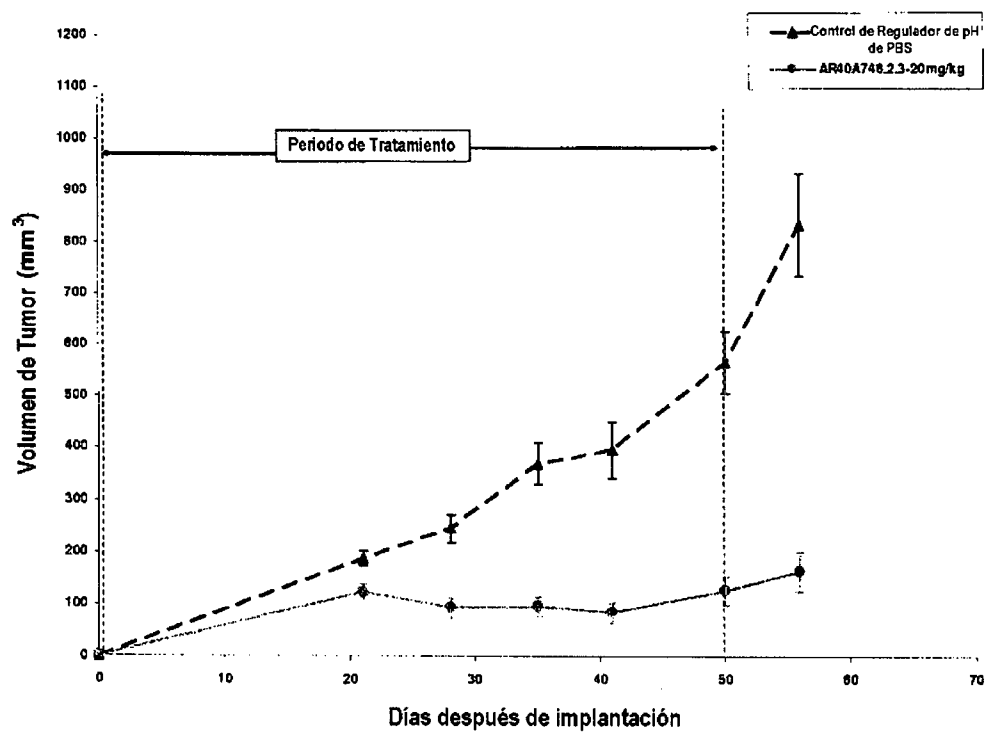
19/39

FIGURA 19



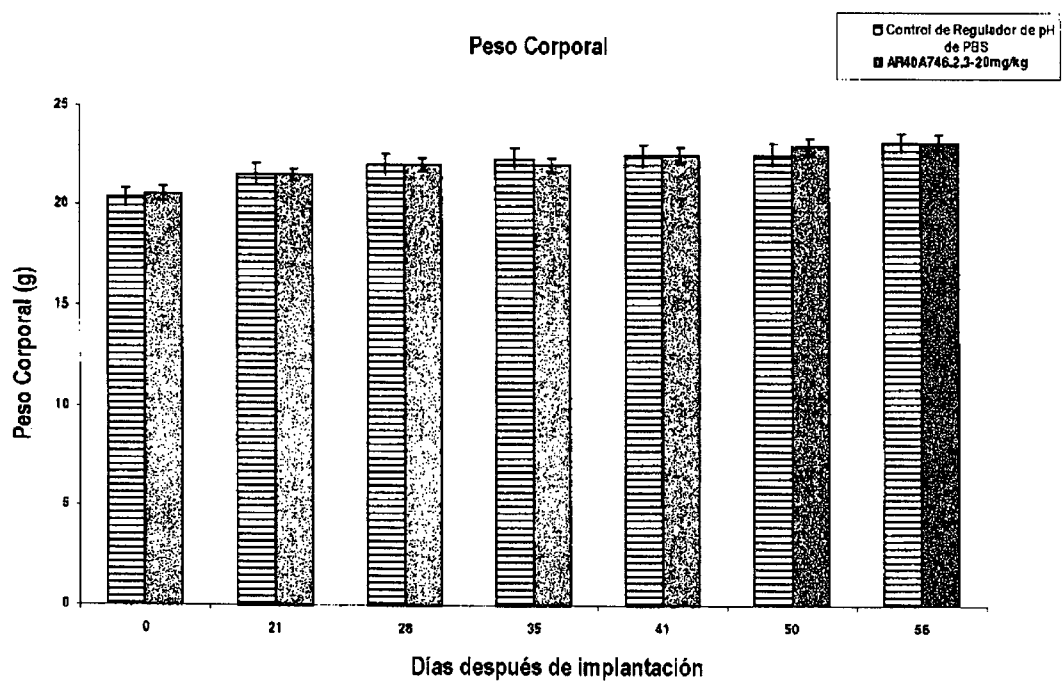
20/39

FIGURA 20



21/39

FIGURA 21



22/39

FIGURA 22A

Sec. No.	Órgano	Punt. de Sección	Especificidad Tissular	Ubicación Celular/Patrón de tinción	Porcentaje De Células Teñidas	Intensidad de tinción
1	Piel	+++	Queratinocitos epidérmicos y vasos sanguíneos	MD	>50%	Moderado-Fuerte
2	Piel	++	Epidermis y glándulas sebáceas	MD	>50%	Moderado-Fuerte
3	Grasa subcutánea	-	-	-	-	Negativo
4	Seno	+/-	Epitelio lobular y fibroblasto intersticial	SF	<50%	Erróneo
5	Seno	+	Epitelio lobular y mioepitelio	MD	>50%	Débil
6	Bazo	+++	Linfocitos en bulbo rojo, endotelio y fibras de músculo suave	CMD	>50%	Moderado-Fuerte
7	Bazo	+	Linfocitos, vasos sanguíneos, endotelio y fibras de músculo suave	CMD	>50%	Débil
8	Nodo linfático	+/-	Endotelio de vasos sanguíneos	SF	<50%	Erróneo
9	Nodo linfático	-	-	-	-	Negativo
10	Músculo Esquelético	+/-	Vasos sanguíneos	SF	<10%	Erróneo
11	Mucosa Nasal	+	Mucosa; epitelio respiratorio	CMD	<50%	Débil
12	Pulmón	+/-	Endotelio de vasos sanguíneos y células intersticiales	SF	<10%	Erróneo
13	Pulmón	+/-	Endotelio de vasos sanguíneos y células intersticiales	SF	<10%	Erróneo
14	Bronquios	++	Epitelio de mucosa y mioepitelio de glándulas mucosas	CMD	50%	Moderado
15	Corazón	++	Endotelio de vasos sanguíneos, fibras de músculo suave y vasos sanguíneos	CMD	>50%	Débil-Moderado
16	Glándula Salival	+++	Epitelio acinar y ductal, mioepitelio y neurofibras	CMD	>50%	Moderado-Fuerte
17	Hígado	++	Sinusoidal y endotelio de vasos sanguíneos	CMD	>50%	Débil-Moderado
18	Hígado	+/-	Sinusoidal y endotelio de vasos sanguíneos	SF	<10%	Erróneo
19	Hígado	-	-	-	-	Negativo
20	Vesícula Biliar	+/-	Fibroblastos de músculo suave y endotelio de vasos sanguíneos	SF	<50%	Erróneo
21	Páncreas	+/-	Isletas de células de Langerhans, fibroblasto intersticial y fibras nerviosas	SF	<50%	Erróneo
22	Páncreas	+/-	Isletas de células de Langerhans, fibroblasto intersticial y fibras nerviosas	SF	<50%	Erróneo
23	Amígdala	+	Epitelio escamoso	CMD	>50%	Débil
24	Esófago	++	Linfocitos	SF	<10%	Erróneo
25	Esófago	++	Capas basales de epitelio escamoso	MD	<50%	Moderado
26	Cuerpo del estómago	+/-	Capas basales de epitelio escamoso	MD	<50%	Moderado
27	Cuerpo del estómago	+/-	Fibras de músculo suave y linfocitos en lámina propia	SF	<10%	Erróneo
28	Cavidad estomacal	+	Fibras de músculo suave y linfocitos en lámina propia	SF	<10%	Erróneo
29	Músculo Suave del estómago	++	Epitelio de glándula basal, endotelio de vasos sanguíneos, fibras de músculo suave y neurofibras	MD	<50%	Débil
30	Duodeno	+	Fibras de músculo suave y fibras nerviosas	CMD	< 50 %	Débil-Moderado
			Células inflamatorias en lámina propia, fibras de músculo suave y endotelio de vasos sanguíneos	CMD	>50%	Débil

23 | 39

FIGURA 22B

31	Intestino delgado	+++	Fibras nerviosas y células variables en lamina propia*	CMD	>50%	Moderado Fuerte
			Fibras de músculo suave	CMD	<50%	Débil
32	Intestino delgado	+	célula variable en lamina propia*	CMD	>50%	Débil
33	Apéndice	+++	célula variable en lamina propia*	CMD	50%	Moderado Fuerte
			Epitelio glandular	SF	<50%	Erróneo
34	Colon	+	célula variable en lamina propia*, epitelio glandular, fibras de músculo suave y fibras nerviosas periféricas	CMD	<50%	Débil
35	Colon	++	Fibras nerviosas y célula variable en lamina propia*	CMD	<50%	Moderado
36	Recto	++	Epitelio glandular de mucosa, células en lamina propia y fibras de músculo suave	CMD	<50%	Moderado
37	Corteza de Riñón	+	epitelio tubular	CMD	<50%	Débil
38	Corteza de Riñón	+	epitelio tubular	CMD	<50%	Débil
39	Médula de Riñón	+/-	epitelio tubular	SF	<50%	Erróneo
40	Vejiga Urinaria	+++	Epitelio transicional de mucosa	MD	>50%	Fuerte
41	Próstata	+++	Epitelio glandular y mioepitelio	CMD	>50%	Fuerte
42	Próstata	+++	Epitelio glandular y mioepitelio	CMD	>50%	Fuerte
43	Vesícula seminal	+	epitelio de mucosa	CMD	>50%	Débil
44	Testículos	+/-	Células de Leydig	SF	<10%	Erróneo
45	Endometrio proliferativo	+	Epitelio glandular de endometrio	MD	>50%	Débil
46	Endometrio	++	Epitelio glandular de endometrio	MD	>50%	Débil
47	Miometrio	-	-	-	-	Negativo
48	Cervix uterino	+/-	epitelio de mucosa	SF	<10%	Erróneo
49	Trompa	NR	NR	NR	NR	NR
50	Ovario	++	Endotelio de vasos sanguíneos y fibras de músculo suave	CMD	<50%	Débil-Moderado
51	Vellosidad de placenta	+/-	células intersticiales	SF	<10%	Erróneo
52	Vellosidad de placenta	+/-	células intersticiales	SF	<10%	Erróneo
53	Cordón umbilical	-	-	-	-	Negativo
54	Glándula adrenal	+	Células endócrinas en corteza y medula	MD	>50%	Débil
55	Tiroides	+/-	Vasos sanguíneos	SF	<10%	Erróneo
56	Timo	++	Glóbulos de Hassall y vasos sanguíneos	MD	>50%	Moderado
57	Materia cerebral blanca	-	-	-	-	Negativo
58	Materia cerebral gris	-	-	-	-	Negativo
59	Cerebelo	-	-	-	-	Negativo
60	Carbono					

Leyenda: Tinción negativa: -, Tinción errónea: +/-, Tinción débil: +, Tinción moderada: ++, Tinción fuerte: +++, M: tinción membranosa, C: tinción citoplásmica, D: Patrón de tinción difusa, G: Patrón de tinción granular, SF: Tinción focal esporádica, N/A: No aplica, *: Células en lamina propia incluyen fibroblastos, macrófagos, linfocitos y otros glóbulos blancos sanguíneos.

24 | 39

FIGURA 23A

Sec. No.	Edad	Sexo	Órgano	Diagnóstico	Punt. de Sección	Especificidad tisular
1	59	M	Piel	Melanoma maligno	++	Células tumorales
2	25	F	Piel	Carcinoma de células escamosas	++	Células tumorales
3	50	F	Seno	Carcinoma ductal infiltrado	-	-
4	57	F	Seno	Carcinoma papilar invasivo	++	Células tumorales
5	35	F	Seno	Carcinoma lobular infiltrado	++	Células tumorales
6	40	M	Nodo linfático	Linfoma maligno, inmunoplástico	+/-	Células tumorales
7	58	M	Nodo linfático	Adenocarcinoma metastásico del estómago	-	Células tumorales
						Fibras nerviosas periféricas
8	53	F	Hueso	Osteosarcoma	+/-	Células tumorales
9	26	M	Hueso	Tumor de célula gigante	-	N/A
10	40	M	Hueso	Condrosarcoma	-	N/A
11	51	F	Tejido suave	Liposarcoma	-	N/A
12	47	F	Tejido suave	Neurofibromatosis	++	Células tumorales
13	74	M	Cavidad nasal	Papiloma invertido	++	Células tumorales
14	57	M	Laringe	Carcinoma de células escamosas	+++	Células tumorales
15	60	M	Pulmón	Adenocarcinoma	+	Células tumorales
16	51	F	Pulmón	Carcinoma de células escamosas	++	Células tumorales
17	68	F	Pulmón	Adenocarcinoma	-	N/A
18	60	M	Pulmón	Carcinoma de célula pequeña	+/-	Células tumorales
19	88	F	Lengua	Carcinoma de células escamosas	++	Células tumorales
20	34	F	Tumor paratiroide	Adenoma pleomórfico	F	F
21	50	F	Tumor paratiroide	Tumor de Warthin	+++	Células de epitelio
22	40	F	Tumor paratiroide	Adenoma pleomórfico	++	Células tumorales
23	56	M	Glándula submandibular	Carcinoma de ducto salival	NR	NR
24	69	F	Hígado	Colangiocarcinoma	+	Células tumorales
						Estroma
25	51	M	Hígado	Carcinoma gástrico metastásico	++	Tumor y área necrótica
26	64	M	Hígado	Carcinoma hepatocelular	+	Tumor y estroma
27	62	F	Vesícula biliar	Adenocarcinoma	-	-
28	64	F	Páncreas	Adenocarcinoma	+	Células tumorales
29	68	M	Esófago	Carcinoma de células escamosas	+++	Células tumorales
30	73	M	Estómago	Adenocarcinoma pobremente diferenciado	+	Células tumorales

25/39

FIGURA 23B

31	63	M	Estómago	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	+	Células tumorales
32	59	F	Estómago	Carcinoma de célula de anillo de Signet	+/-	Células tumorales
33	62	M	Estómago	Linfoma maligno	-	N/A
34	51	M	Estómago	Tumor de estroma límite	+	Células tumorales
35	42	M	Intestino delgado	Tumor de estroma maligno	-	N/A
36	52	F	Apéndice	Pseudomixoma peritonía	-	N/A
37	53	M	Colon	Adenocarcinoma	+	Células tumorales
38	67	M	Recto	Adenocarcinoma	NR	NR
39	75	F	Riñón	Carcinoma celular transitorio	+++	Células tumorales
40	54	F	Riñón	Carcinoma celular renal	+	Células tumorales
41	75	F	Riñón	Carcinoma celular renal	++	Células tumorales
42	65	M	Vejiga urinaria	Carcinoma diferenciado pobremente	+	Células tumorales Área necrótica
43	67	M	Vejiga urinaria	Carcinoma celular transitorio, grado Alto	+++	Células tumorales
44	62	M	Próstata	Adenocarcinoma	+++	Células tumorales
45	30	M	Testículos	Seminoma	++	Células tumorales
46	68	F	Útero	Adenocarcinoma endometrial	+	Células tumorales
47	57	F	Útero	Leiomioma	+	Células tumorales
48	45	F	Útero	Leiomioma	-	-
49	63	F	Cervix uterino	Carcinoma de células escamosas	+++	Células tumorales
50	12	F	Ovario	Tumor de seno endodérmico	NR	NR
51	33	F	Ovario	Adenocarcinoma de mucosidad	+/-	Células tumorales
52	70	F	Ovario	Fibrotecoma	+/-	Células tumorales
53	67	F	Glándula adrenal	Carcinoma cortical	-	N/A
54	61	F	Glándula adrenal	Feohromcitoma	-	N/A
55	54	M	Tiroide	Carcinoma papilar	+	Células tumorales
56	58	F	Tiroide	Carcinoma follicular mínimamente invasivo	++	Células tumorales
57	74	M	Timo	Timoma	+/-	Células tumorales
58	66	F	Cerebro	Meningioma	+	Células tumorales
59	62	M	Cerebro	Glioblastoma multiforme	+++	Células tumorales
60	64	F	Nodo linfático	Melanoma maligno	Tumor pigmentado	

26 | 39

FIGURA 23C

1	36	F	Piel	Normal	++	Queratinocitos
						Endotelio de vasos sanguíneos
2	37	F	Seno	Normal	+	Fibroblasto de estroma y endotelio de vasos sanguíneos
						Epitelio ductal
3	63	M	Bazo	Normal	++	Endotelio sinusoidal y células reticulares
4	67	M	Músculo esquelético	Normal	-	-
5	60	M	Pulmón	Normal	+	células intersticiales y macrófagos
6	42	F	Hígado	Normal	+	Endotelio de vasos sanguíneos
7	41	M	Cuerpo estomacal	Normal	++	Endotelio de vasos sanguíneos
						Epitelio glandular
8	53	M	Colon	Normal	++	Fibras nerviosas periféricas
						Fibroblasto en lamina propia
9	35	M	Riñón	Normal	++	Epitelio tubular
10	70	M	Próstata	Normal	+++	Epitelio glandular y mioepitelio
11	30	F	Placenta	Normal	+/-	Vasos sanguíneos
12	0	F	Cerebro	Normal	-	-
13	26	F	Seno	Carcinoma ductal infiltrado	-	-
14	59	M	Pulmón	Carcinoma de células escamosas	+++	Células tumorales
15	54	M	Hígado	Carcinoma hepatocelular	-	-
16	52	M	Esófago	Carcinoma de células escamosas	++	Células tumorales
17	49	M	Estómago	Adenocarcinoma	-	-
18	39	M	Intestino delgado	Tumor estromal maligno	-	-
19	57	F	Recto	Adenocarcinoma	+/-	Células tumorales
20	44	F	Riñón	Carcinoma celular renal	-	-
21	56	F	Vejiga urinaria	Carcinoma celular transitorio	+++	Células tumorales
22	67	F	Útero	Carcinoma endometrial	++	Células tumorales
23	34	F	Ovario	Cistadenocarcinoma mucoso	+	Células tumorales
24	64	F	Nodo linfático	Melanoma maligno metastásico		Tumor pigmentado

Leyenda: Tinción negativa: -, Tinción errónea: +/-, Tinción débil: +, Tinción moderada: ++, Tinción fuerte: +++, N/A: No aplicable, NF: No representativo, F: sección doblada.

27 | 39

FIGURA 24

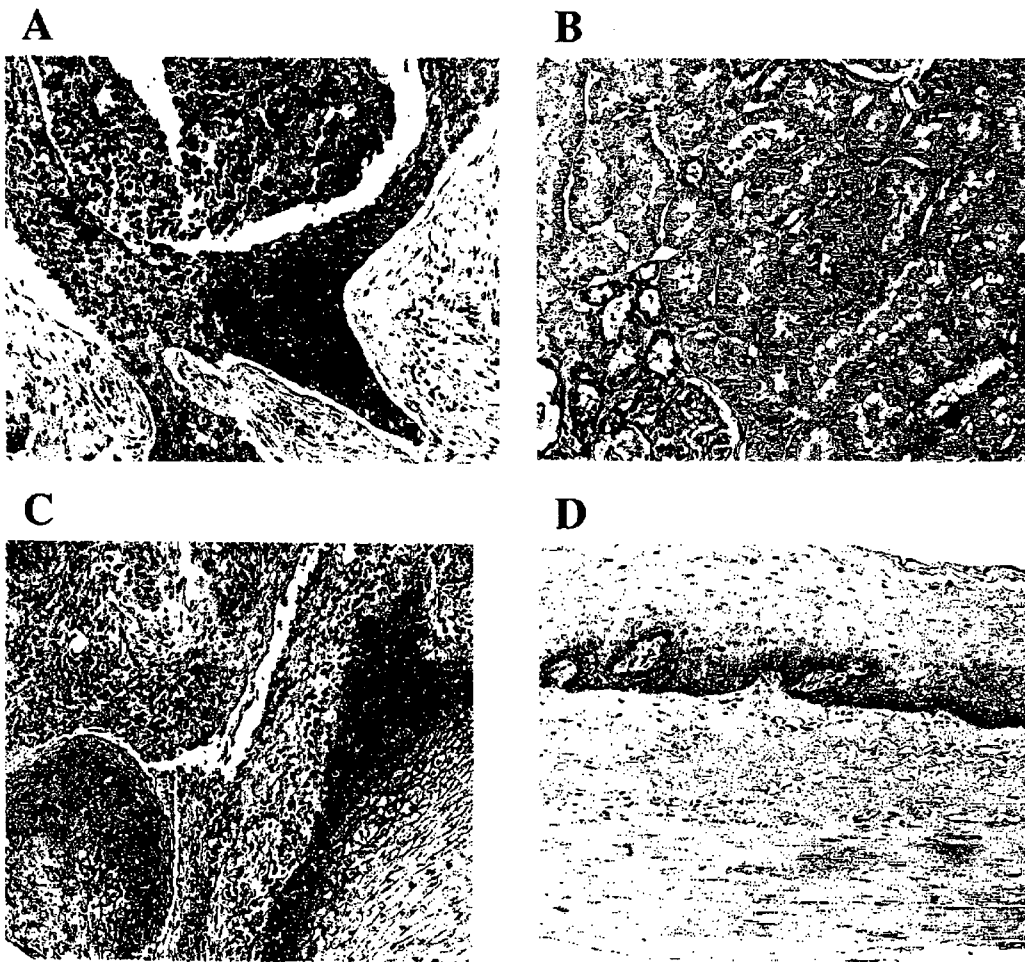


FIGURA 25

Puntuación IHC	-	+/-	+	++	+++	Total	Total ++, +++	Total +/-, +	Positivo Total
Tumor	8	5	7	6	5	31	11/31 (36%)	12/31 (39%)	23/31 (74%)
Tipos histológicos									
Adenocarcinoma ductal	8	5	7	5	4	29	9/29 (31%)	12/29 (41%)	21/29 (72%)
Carcinoma endócrino	0	0	0	1	1	2	2/2 (100%)	0	2/2 (100%)
Grado histológico / Adenocarcinoma									
No. total 29 tumores de adenocarcinoma ductal									
G1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
G1-G2	1	1	1	0	0	3	0	2/3 (67%)	2/3 (67%)
G2	3	2	2	3	1	11	4/11 (36%)	4/11 (36%)	8/11 (73%)
G2-G3	1	0	0	0	1	2	1/2 (50%)	0	1/2 (50%)
G3	1	0	3	2	0	6	2/6 (33%)	3/6 (50%)	5/6 (83%)
G4	0	1	0	0	0	1	0	1/1 (100%)	1/1 (100%)
Desconocido	1	1	1	0	2	5	2/5 (40%)	2/5 (40%)	4/5 (80%)
Etapas TNM / Adenocarcinoma									
No. total 29 tumores de adenocarcinoma ductal									
Etapas I	0	0	1	0	0	1	0	1/1 (100%)	1/1 (100%)
Etapas II	5	2	3	3	3	16	6/16 (38%)	5/16 (31%)	11/16 (69%)
Etapas III	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Etapas IV	2	3	3	2	1	11	3/11 (27%)	6/11 (55%)	9/11 (82%)
Páncreas normal	0	1	2	1	0	4	1/4 (25%)	3/4 (75%)	4/4 (100%)

28 / 29

29/39

FIGURA 26

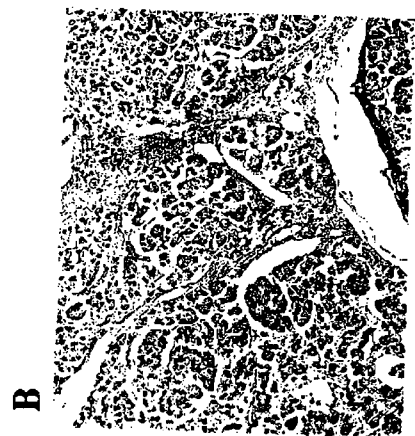


FIGURA 27

Órganos / Especies	Humano	Chimpanco	Rhesus	Conejo	Ratón	Oveja
Corazón	++ (endotelio y fibras de músculo suave de vasos sanguíneos)	+ (endotelio y endotelio de vasos sanguíneos)	++ (Endotelio y endotelio de vasos sanguíneos)	*+/- (endotelio vasos sanguíneos)	-	-
Cerebro	-	+++ (neuronas y neuroglia en materia gris y blanca)	+++ (neuronas y neuroglia en materia gris y blanca)	+++ (materia blanca)	-	-
Vagija urinaria	+++ (epitelio transitorio de mucosa)			++ (epitelio de mucosa y endotelio)	-	-
Testículos	+/- (células de Leydig)			+/- (espermatozoides y endotelio de vasos sanguíneos)	-	-
Colon	++ (células variadas en lamina propia, epitelio glandular, fibras de músculo suave y fibras nerviosas periféricas)			+/- (endotelio de vasos sanguíneos)	-	-
Intestino delgado	++ (células variadas en lamina propia, fibras nerviosas, fibras de músculo suave)	+/- (endotelio de vasos sanguíneos)	++ (epitelio glandular, de mucosa y SMF)	++ (epitelio de mucosa, endotelio y células de ganglios en músculos)	-	-
Estómago	+/-, +, ++ (epitelio glandular basal, fibroblasto y linfocitos en lamina propia, fibras de músculo suave y fibras nerviosas)		-	+ (epitelio glandular y endotelio)	-	-
Piel	++ (epidermis y glándulas sebáceas, queratinocitos epidérmicos y vasos sanguíneos)				-	-
Músculo esquelético	++ (vasos sanguíneos)	+/- (endotelio de vasos sanguíneos)	+/- (endotelio de vasos sanguíneos)	+/- (endotelio de vasos sanguíneos)	-	-
Riñón	+/-, + (epitelio tubular)	+++ (epitelio tubular y glomerula)	+++ (epitelio tubular y glomerula)	+ (epitelio y endotelio tubular)	-	-
Bazo	++ (linfocitos, vasos sanguíneos, endotelio y fibras de músculo suave)	+++ (linfocitos, neutrófilos y endotelio)	+++ (linfocitos, neutrófilos y endotelio)	+++ (linfocitos y endotelio)	-	-
Hígado	+/-, ++ (sinusoides y endotelio de vasos sanguíneos)	+ (células sinusoidales y endotelio de vasos sanguíneos, hepatocitos y epitelio de ducto biliar)	++ (células sinusoidales y endotelio de vasos sanguíneos, hepatocitos y epitelio de ducto biliar)		-	-
Pulmón	+/- (endotelio de vasos sanguíneos y células intersticiales)	+++ (epitelio pulmonar y bronquial y células intersticiales)	+++ (epitelio pulmonar y bronquial y células intersticiales)	+/- (células intersticiales)	-	-
Páncreas	+/- (isletas de células de Langerhans, fibroblasto intersticial y fibras nerviosas)	++ (isletas de Langerhans, endotelio de vasos sanguíneos y epitelio acinar)	+++ (epitelio de ducto grande, isletas de Langerhans, endotelio de vasos sanguíneos y epitelio acinar)			

Datos no disponibles

FIGURA 28

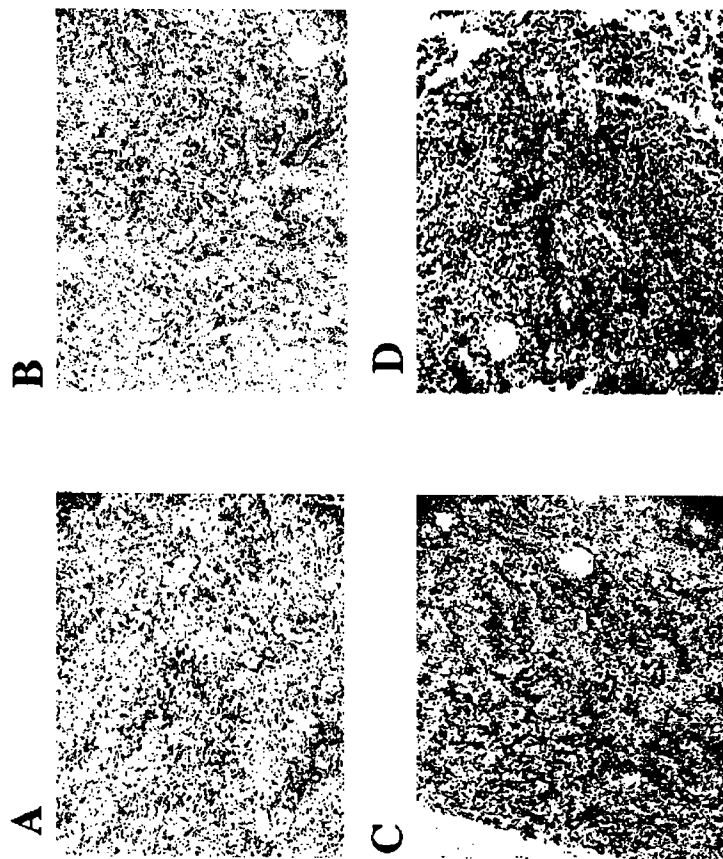


FIGURA 29

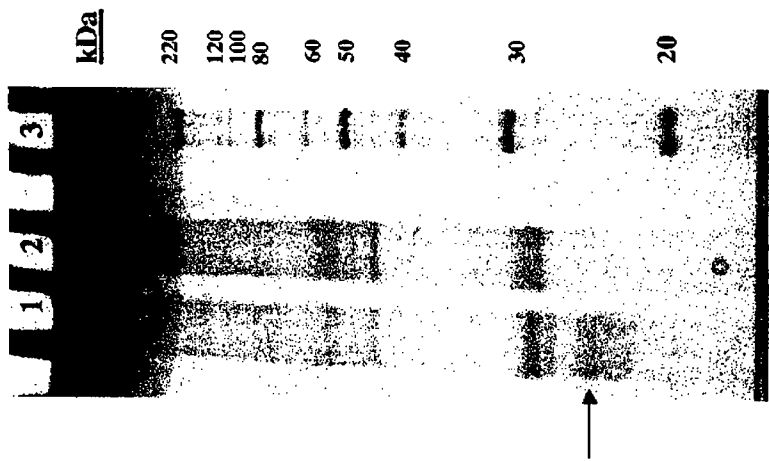


FIGURA 30

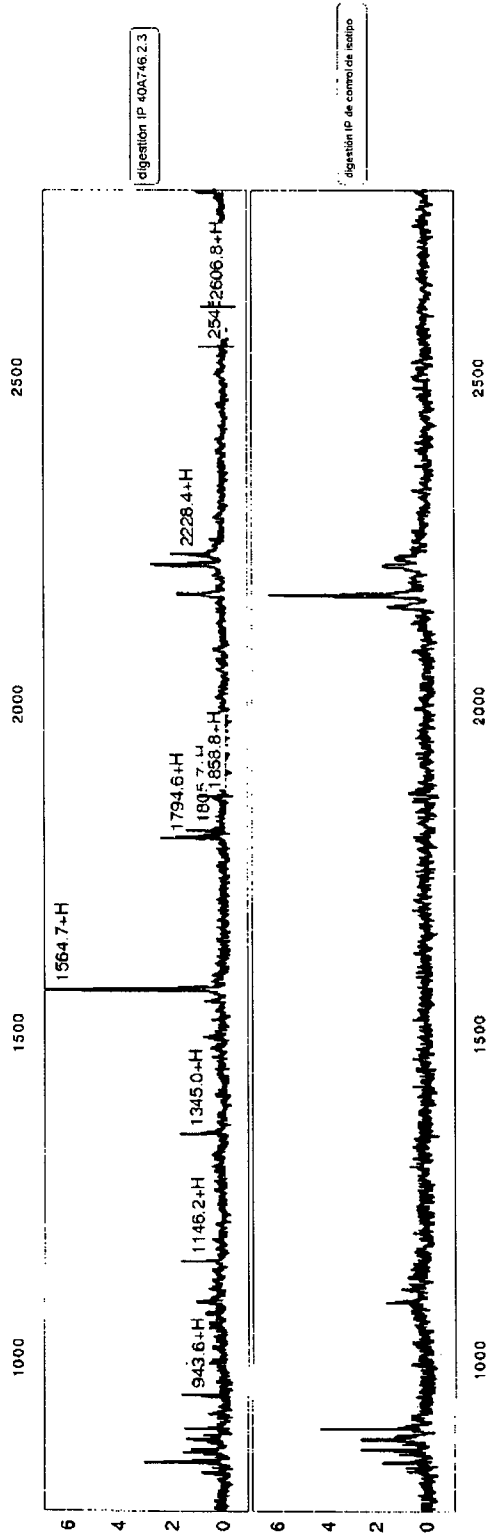


FIGURA 31

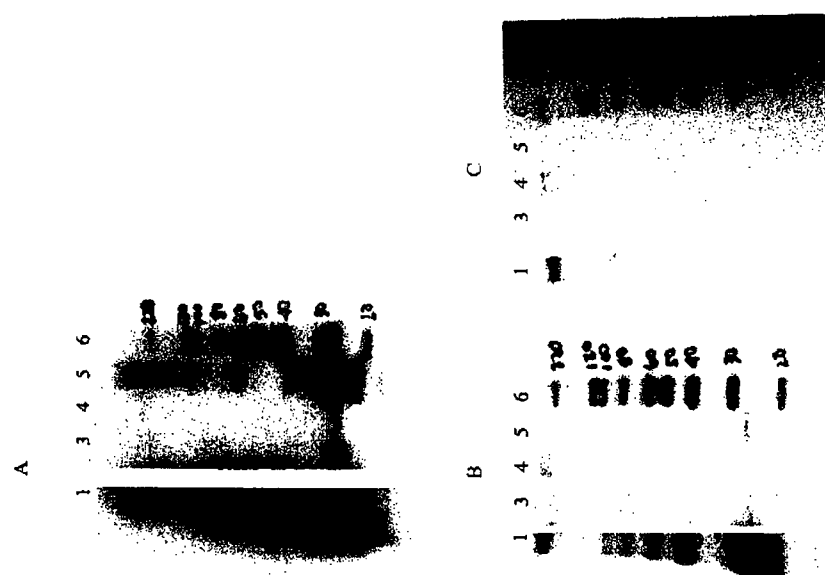


FIGURA 32

Código Arius	Secuencia	Longitud	Nombre
Olg-06-95	ACTAGTCGACATGAGAGTGTGCTGATTCCTTTTGTTG	33	nMulgVh5-F3
olg-07-217	TGTTTCACAGCCTTTCCTGGTATCC	24	40A746Vh-26F
olg-07-218	TGCTGATTCCTTTTGTTGGCTGTTCAC	25	40A746vh-8F
olg-06-98	CCCAAGCTTCCAGGGGCCARKGATARACIGRTGG	35	nMulgGVh3-2
olg-06-109	ACTAGTCGACATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCCTTG	35	MulgKVL5-F3
olg-07-219	TCAGTTCCCTTGGTCTCCTGTGCTC	25	40A746Vk-15F
olg-07-220	TCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGTACC	26	40A746Vk-26F
olg-06-115	CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	30	nMulgKVL3-1
olg-06-118	CGCGGATCCGAAGATAGGATGGAGCTGG	28	Light RT

35/39

36139

FIGURA 33

AR40A746.2.3 Cadena Ligera
SEQ ID NO:8

1 10 20 24
D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C S A
26 30 34 40 50
S Q G I S N Y L N W Y Q Q K P D G N V K L L I Y Y
CDR1
51 56 60 70
T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I
CDR2
76 80 89 97 100
S N L E P E D I A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G
CDR3
101
G T K L E I K R A

AR40A746.2.3 Cadena Pesada
SEQ ID NO:7

1 10 20 25
D V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C T V T
26 30 31 35 35A 40 49
G Y S I T S D Y A W N W I R Q F P G N K L E W M G
CDR1
50 60 65 70 74
Y I S Y S G F T N Y N P S L K S R I S I T R D T S
CDR2
75 80 82A 82B 82C 90 95
K N Q F F L Q L S S V T T E D T A T Y F C E G G N
CDR3
97 100A 102 110
Y R Y S W F P Y W G Q G T L V T V S A

FIGURA 34

Lista de cinasas cuya fosforilación se afecta por tratamiento de células BxPC-3 tratadas con AR40A746.2.3 seguido por suero y estimulación complementaria.

Proteína fosforilada (Objetivo)	Coordinar en Membrana de Perfil	Fosforilación Relativa Promedio con Tratamiento de AR40A746.2.3 (Porcentaje de Control)	Cambio Por Ciento con AR40A746.2.3 (Porcentaje de Control)
Rsk	B13,14	53.8	46.2
GSK3a/f3	B15,16	79.4	20.6
GSK313	C15,16	49.0	51.0
Akt 1	B17,18	82.9	17.1
Akt 2	B 19,20	56.1	43.9
Akt 3	C17,18	51.0	49.0
Pan Akt	C19,20	78.4	21.6
HSP27	D15,16	50.6	49.4

37/39

FIGURA 35

Lista de RTKs cuya fosforilación se afecta por tratamiento de células BxPC-3 tratadas con AR40A746.2.3 seguido por suero y estimulación complementaria.

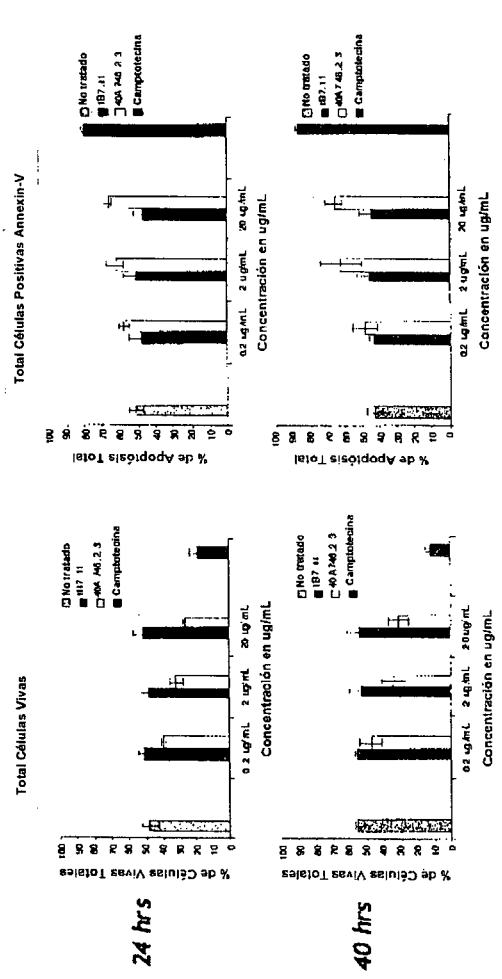
Proteína fosforilada (Objetivo)	Coordinar en Membrana de Perfil	Fosforilación Relativa Promedio con Tratamiento de AR40A746.2.3 (Porcentaje de Control)	Cambio Relativo Promedio en Fosforilación (Porcentaje de Control)
Erb B3	B5,6	71.7	28.3
Erb B4	B7,8	23.0	77.0
FGF RI	B9,10	40.5	59.5
FGF R3	B13,14	15.3	84.7
MSP R	C5,6	60.5	39.5
Flt 3	C13,14	5.6	94.4
c-Ret	C17,18	45.2	54.8
Tie-2	D1,2	28.4	71.6
Trk A	D3,4	131.6	31.6
VEGF R3	D13,14	46.3	53.7

38 | 39

39139

FIGURA 36

Efectos apoptóticos del anticuerpo AR40A746.2.3 murino sobre la línea celular pancreática BxPC-3 a las 24 y 40 horas obtenidos por los experimentos de tinción con Annexin-V



Casilla No. VIII (ii) DECLARACION: DERECHO A SOLICITAR Y QUE SE OTORQUE UNA PATENTE

La declaración debe ajustarse a la redacción estandarizada suministrada en la Sección 212; ver las Notas a las Casillas Nos. VIII, VIII(i) a (v) (en general) y a las Notas específicas a la Casilla No. VIII (ii). Si no se usa esta casilla, esta hoja no debe incluirse en la solicitud.

Declaración en cuanto al derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, a solicitar y que se le otorgue una patente (Reglas 4.17(ii) y 51bis.1(a)(ii), en un caso donde la declaración bajo la Regla 4.17(iv) no es apropiada:

en relación con esta solicitud internacional:

ARIUS RESEARCH INC. tiene autorización para solicitar y que se le otorgue una patente en virtud de lo siguiente:

un traspaso de

YOUNG, David S. F., 33 University Avenue, Suite 2407, Toronto, Ontario M5J 2S7 CANADA;
FINDLAY, Helen P., 205 Glendonwyne Road, Toronto, Ontario M6P 3E9 CANADA;
HAHN, Susan E., 9 Innisfree Court, Toronto, Ontario M6S 3N7 CANADA;
CECHETTO, Lisa M., Unit 303 de JSD Ville II, 653-31 Hannam-dong, Yongsan-gu, Seúl 140-210 Corea del Sur; y
FERRY, Alison L., 143 Grenadier Crescent, Thornhill, Ontario L4J 7V6 CANADA.

a ARIUS RESEARCH INC., fechado el 16 de Noviembre de 2007, 28 de Noviembre de 2007, 15 de Septiembre de 2007, 27 de Noviembre de 2007, y 22 de Noviembre de 2007, respectivamente.

☐ Esta declaración continúa en la página siguiente, "Continuación de la Casilla No. VIII(ii)".

Formato PCT/RO/101 (hoja de declaración(ii)) (Enero de 2004) Ver Notas al formato de la solicitud

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to this international application:

ARIUS RESEARCH INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

an assignment from:

YOUNG, David S. F., 33 University Avenue, Suite 2407, Toronto, Ontario M5J 2S7 CANADA;

FINDLAY, Helen P., 205 Glendonwyne Road, Toronto, Ontario M6P 3E9 CANADA;

HAHN, Susan E., 9 Innisfree Court, Toronto, Ontario M6S 3N7 CANADA;

CECHETTO, Lisa M., Unit 303 of JSD Ville II, 653-31 Hannam-dong, Yongsan-gu, Seoul 140-210 SOUTH KOREA; and

FERRY, Alison L., 143 Grenadier Crescent, Thornhill, Ontario L4J 7V6 CANADA.

to ARIUS RESEARCH INC., dated 16 November 2007, 28 November 2007, 15 September 2007, 27 November 2007, and 22 November 2007, respectively.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-027142- -00000-0000

Fecha: 2010-03-08 16:13:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

1 ☒	Indicación que se solicita una PCT
31 ☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
219 ☒	Dibujos de ser estos pertinentes
213 ☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño Industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá,
2020

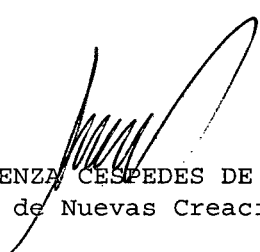
Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
F. HOFFMANN - LA ROCHE AG

REFERENCIA	Radicación No.	10 27142
	Solicitud internacional	PCT/CA2008/001452
	Fecha inicio fase nacional	17/03/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	4307

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 26 MAR. 2010
adpall



Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
F. HOFFMANN - LA ROCHE AG

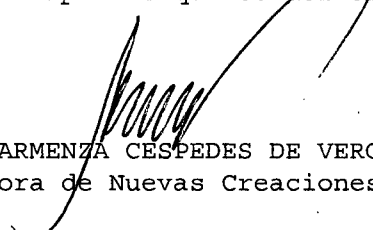
REFERENCIA	Radicación No.	10 27142
	Solicitud internacional	PCT/CA2008/001452
	Fecha inicio fase nacional	17/03/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	4308

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 26 MAR 2010
adpall