



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 363**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02807155 .3**
96 Fecha de presentación : **01.10.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1494693**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2005**

54 Título: **Anticuerpos específicos de Cripto.**

30 Prioridad: **22.03.2002 US 367002 P**
17.04.2002 PCT/US02/11950

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.03.2011

73 Titular/es: **BIOGEN IDEC MA Inc.**
14 Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US

72 Inventor/es: **Sanicola-Nadel, Michele;**
Adkins Huet, Heather;
Miklasz, Steven Donald;
Rayhorn, Paul;
Schiffer, Susan Gail y
Williams, Kevin

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 355 363 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US02/11950, presentada el 24 de abril de 2002, que reivindica
 5 prioridad de las Solicitudes de Estados Unidos N° 60/367.002, presentada el 22 de marzo de 2002; 60/301.091, presentada el 26 de junio de 2001; 60/293.020, presentada el 17 de mayo de 2001; y 60/286.782, presentada el 26 de abril de 2001.

Campo Técnico de la Invención

10 Esta invención se refiere en líneas generales a los campos de la genética y la biología celular y molecular. Más particularmente, la invención se refiere a anticuerpos anti-Cripto.

Antecedentes de la Invención

Cripto es una proteína de superficie celular de 188 aminoácidos. Se aisló
 15 casualmente en una exploración de ADNc de una biblioteca de carcinoma embrionario humano (Ciccodicola et al., 1989, EMBO J. 8:1987-91). La proteína Cripto tiene al menos dos dominios notables: un dominio rico en cisteína (cys-rico), y un primer dominio caracterizado como similar al dominio hallado en la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Cripto se clasificó
 20 originalmente como un miembro de la familia EGF (Ciccodicola et al., supra); sin embargo, el posterior análisis mostró que Cripto no se unía a ninguno de los receptores conocidos de EGF y su dominio tipo EGF era realmente divergente de la familia EGF (Bianco et al., 1999, J. Biol. Chem. 274:8624-29).

La vía de señalización de Cripto ha permanecido esquiva a pesar de la
 25 investigación continuada. La bibliografía apoya la activación de varias vías diferentes, incluyendo la vía de la MAP quinasa (DeSantis et al., 1997, Cell Growth Differ. 8:1257-66; Kannan et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:3330-35); la vía de TGF- β (Gritsman et al., 1999, Development 127:921-32; Schier et al., 2000, Nature 403:385-89); interacciones posibles con la vía Wnt (Salomon et al., 2000, Endocr. Relat. Cancer. 7:199-226); e interferencia con la vía del EGF
 30 (Bianco et al., 1999, J. Biol. Chem. 274:8624-29).

La Patente de Estados Unidos 5.256.643 y dos patentes relacionadas con la misma (Patentes de Estados Unidos 5.654.140 y 5.792.616) describen un gen Cripto humano, la proteína Cripto, y anticuerpos contra Cripto.

35 La Patente de Estados Unidos 5.264.557 y tres patentes relacionadas

con la misma (Patentes de Estados Unidos 5.620.866, 5.650.285, y 5.854.399) describe un gen y proteína relacionados con Cripto humana. También se describen anticuerpos que se unen a la proteína relacionada con Cripto pero que no reacciona de forma cruzada por unión a la propia proteína Cripto.

5 La sobre-expresión de la proteína Cripto está asociada con tumores en muchos tejidos (incluyendo, aunque sin limitación, cerebro, mama, testículos, colon, pulmón, ovario, vejiga, útero, cuello del útero, páncreas y estómago), como se demuestra por la inmunotinción de tejido humano con anticuerpos policlonales de conejo creados contra péptidos Cripto pequeños. Panico et al.,
 10 1996, Int. J. Cancer 65:51-56; Byrne et al., 1998, J. Pathology 185:108-11; De Angelis et al., 1999, Int. J. Oncology 14:437-40. Por lo tanto, la técnica necesita un medio para controlar, restringir, y/o prevenir dicha sobre-expresión, inhibir la actividad de Cripto, e inhibir las consecuencias de la expresión de Cripto (es decir, la promoción y/o mantenimiento de la transformación celular).

15 Sumario de la Invención

Esta invención proporciona nuevos anticuerpos que se unen específicamente a Cripto, y métodos para crear y usar dichos anticuerpos. La invención también proporciona anticuerpos que se unen a Cripto, e inhiben la actividad o la interacción proteica de Cripto, por ejemplo, un anticuerpo que se
 20 une a Cripto de modo que la señal resultante de una interacción proteica con Cripto está modulada a la baja. La invención también proporciona anticuerpos que se unen a Cripto y bloquean la interacción entre Cripto y ALK4. La invención también proporciona anticuerpos que se unen a Cripto y bloquean la interacción entre Cripto y Activina B. La invención también proporciona
 25 anticuerpos que se unen a Cripto e inhiben el crecimiento tumoral. La invención también proporciona anticuerpos que se unen a Cripto, inhiben la actividad de Cripto e inhiben el crecimiento tumoral. La invención también proporciona anticuerpos que se unen a Cripto, bloquean la interacción entre Cripto y ALK4 y/o entre Cripto y Activina B, e inhiben el crecimiento tumoral.

30 En un aspecto de la invención, el anticuerpo de la invención se une específicamente a un epítipo seleccionado entre el grupo de epítipos a los que se unen los anticuerpos A8G3.5 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3317).

En otro aspecto de la invención, un anticuerpo de la invención se une específicamente a un epítipo en el dominio de unión ligando/receptor de
 35 Cripto. Cripto puede seleccionarse entre CR-1 (SEC ID Nº 1) o CR-3 (SEC ID

Nº 2). Los anticuerpos que se unen específicamente al epítipo en el dominio de unión ligando/receptor incluyen, por ejemplo, A6C12.11, A6F8.6 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3318), A7H1.19, A8F1.30, A8G3.5 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3317), A8H3.1 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3315),
 5 A8H3.2, A10A10.30, A19A10.30, A10B2.17, A10B2.18 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3311), A27F6.1 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3310), A40G12.8 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3316), A2D3.23, A7A10.29, A9G9.9, A15C12.10, A15E4.14, A17A2.16, A17C12.28, A17G12.1 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3314), A17H6.1, A18B3.11 (Nº DE ACCESO A LA
 10 ATCC PTA-3312), A19E2.7, B3F6.17 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3319), B6G7.10 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3313), 1-1A4C.2, 2-2C9.2, 2-3H9.2, 2-4E5.6, 2-4D1.3, 3-4E8.3, 3-3G1.1, 4-2F6, 4-3A7 y 4-1E2.

En algunas realizaciones, el epítipo al que se unen los anticuerpos de la invención está en un dominio tipo EGF. Los anticuerpos que se unen
 15 específicamente a un epítipo en el dominio tipo EGF incluyen, aunque sin limitación, A40G12.8 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3316), A8H3.1 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3315), A27F6.1 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3310), B6G7.10 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3313), A17G12.1 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3314), A18B3.11 (Nº DE ACCESO A LA ATCC
 20 PTA-3312), 1-1A4C.2, 2-2C9.2 y 2-4D1.3.

En otras realizaciones, el epítipo al que se unen los anticuerpos de la invención está en un dominio cys-rico. Los anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo en el dominio cys-rico incluyen, aunque sin limitación, A19A10.30, A8G3.5 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3317),
 25 A6F8.6 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3318), A6C12.11, 1-1A4C.2 y 2-2C9.2.

Los anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo en el extremo amino incluyen, aunque sin limitación, A10B2.17.

Los anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo en el
 30 dominio que abarca los residuos de aminoácidos 46-62 de Cripto incluyen, aunque sin limitación, A10B2.18 (ATCC ACCESSION NO. (PTA-3311) B3F6.17 (ATCC ACCESSION NO. PTA3319), A17A2.16, 2-3H9.2, 2-4E5.6, 2-4D1.3, 3-4E8.3, 3-1E7.2 y 3-3G1.1.

En otras realizaciones, el epítipo al que se unen los anticuerpos de la
 35 invención está en los polipéptidos CR40 (SEC ID Nº 3), CR41 (SEC ID Nº 4),

CR43 (SEC ID N° 5), CR44 (SEC ID N° 6), CR49 (SEC ID N° 7), CR50 (SEC ID N° 8) o CR51 (SEC ID N° 9). Los anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo en uno de estos polipéptidos incluyen, aunque sin limitación, A6C12.11, A6F8.6, A7H1.19, A8F1.30, A8G3.5, A8H3.1, A8H3.2, A10A10.30, A19A10.30, A10B2.17, A10B2.18, A27F6.1, A40G12.8, A2D3.23, A7A10.29, A9G9.9, A15C12.10, A15E4.14, A17A2.16, A17C12.28, A17G12.1, A17H6.1, A18B3.11, A19E2.7, B3P6.17, B6G7.10, 1-1A4C.2, 2-2C9.2, 2-3H9.2, 2-4E5.6, 2-4D1.3, 3-4E8.3, 3-3G1.1, 4-2F6, 4-3A7 y 4-1E2.

Esta invención también incluye anticuerpos que se unen específicamente a Cripto y son capaces de inhibir la actividad de Cripto. Los anticuerpos que se unen específicamente a Cripto y son capaces de inhibir la actividad de Cripto incluyen, aunque sin limitación, A40G12.8 (N° DE ACCESO A LA ATCC PTA-3316), A8H3.1 (N° DE ACCESO A LA ATCC PTA-3315), A27F6-1 (N° DE ACCESO A LA ATCC PTA-3310), A6C12.11, 1-1A4C.2 y 2-2C9.2. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención que se unen específicamente a Cripto y son capaces de inhibir la actividad de Cripto se unen a un epítipo en un dominio tipo EGF o un dominio cys-rico de Cripto.

Esta invención también incluye anticuerpos que se unen específicamente a Cripto y bloquean la interacción entre Cripto y ALK4. Los anticuerpos que se unen específicamente a Cripto y son capaces de bloquear la interacción entre Cripto y ALK4, incluyen aunque sin limitación, A8G3.5 (N° DE ACCESO A LA ATCC PTA-3317), A6F8.6 (N° DE ACCESO A LA ATCC PTA-3318), A6C12.11, 1-1A4C.2 y 2-2C9.2. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención que se unen específicamente a Cripto y son capaces de bloquear la interacción entre Cripto y ALK4 se unen a un epítipo en un dominio tipo EGF o un dominio cys-rico de Cripto.

Esta invención también incluye anticuerpos que se unen específicamente a Cripto y bloquean la interacción entre Cripto y Activina B. Los anticuerpos que se unen específicamente a Cripto y son capaces de bloquear la interacción entre Cripto y Activina B incluyen, aunque sin limitación, A8G3.5 (N° DE ACCESO A LA ATCC PTA-3317) y 1-1A4C.2. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención que se unen específicamente a Cripto y son capaces de bloquear la interacción entre Cripto y Activina B se unen a un epítipo en un dominio cys-rico de Cripto.

En otro aspecto, esta invención incluye anticuerpos que se unen

específicamente a Cripto y son capaces de inhibir el crecimiento tumoral. Los anticuerpos que se unen específicamente a Cripto y son capaces de inhibir el crecimiento tumoral incluyen, aunque sin limitación, A27F6.1 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3310), B6G7.10 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3313) y
 5 A8G3.5 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3317), 1-1A4C.2 y 2-2C9.2.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención que se unen específicamente a Cripto y son capaces de inhibir el crecimiento tumoral se unen a un epítipo en un dominio tipo EGF o un dominio cys-rico de Cripto.

En otro aspecto más, esta invención incluye anticuerpos que se unen
 10 específicamente a Cripto, que son capaces de inhibir la actividad de Cripto, y que son capaces de inhibir el crecimiento tumoral. Los anticuerpos que se unen a Cripto, que son capaces de inhibir la actividad de Cripto, y que son capaces de inhibir el crecimiento tumoral incluyen, aunque sin limitación, A27F6.1 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3310), A8G3.5, 1-1A4C.2 y 2-2C9.2.

15 En algunas realizaciones, los anticuerpos de esta invención que se unen específicamente a Cripto, que son capaces de inhibir la actividad de Cripto, y que son capaces de inhibir el crecimiento tumoral se unen a un epítipo en un dominio tipo EGF o un dominio cys-rico de Cripto.

En otro aspecto más, esta invención incluye anticuerpos que se unen
 20 específicamente a Cripto, que son capaces de bloquear la interacción entre Cripto y ALK4, y que son capaces de inhibir el crecimiento tumoral. Los anticuerpos que se unen específicamente a Cripto, que son capaces de bloquear la interacción entre Cripto y ALK4, y que son capaces de inhibir el crecimiento tumoral incluyen, aunque sin limitación, A8G3.5 (Nº DE ACCESO A
 25 LA ATCC PTA-3317), 1-1A4C.2 y 2-2C9.2.

En otro aspecto más, esta invención incluye anticuerpos que se unen específicamente a Cripto, que son capaces de bloquear la interacción entre Cripto y Activina B, y que son capaces de inhibir el crecimiento tumoral. Los anticuerpos que se unen específicamente a Cripto, que son capaces de
 30 bloquear la interacción entre Cripto y Activina B, y que son capaces de inhibir el crecimiento tumoral incluyen, aunque sin limitación, A8G3.5 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3317) y 1-1A4C.2.

En otro aspecto, la invención incluye un método para inhibir la unión de Cripto a Activina B en una muestra, que comprende añadir a la muestra un
 35 anticuerpo que se une específicamente a Cripto y que es capaz de bloquear la

interacción entre Cripto y Activina B. En un aspecto relacionado, la invención se basa en la inhibición de la unión de Cripto a Activina B en un mamífero, que comprende el uso de un anticuerpo que se une específicamente a Cripto y que es capaz de bloquear la interacción entre Cripto y Activina B en el tratamiento

5 de un mamífero.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo compuesto por A8G3.5 (Nº de acceso a la ATCC PTA-3317).

Los anticuerpos de la invención incluyen, aunque sin limitación,

10 anticuerpos monoclonales, policlonales, humanizados, quiméricos y humanos.

Esta invención también proporciona una composición para su administración a un mamífero que tiene un tumor que expresa Cripto que comprende al menos uno de los anticuerpos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano. La composición puede

15 incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los anticuerpos descritos anteriormente pueden conjugarse a un agente quimioterapéutico o pueden proporcionarse en combinación con un agente quimioterapéutico no conjugado.

En otro aspecto de la invención se incluyen métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vitro* en una muestra que comprende la

20 etapa de añadir a la muestra una composición descrita anteriormente.

También se incluyen usos en métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo* en un mamífero que comprende el uso en el mamífero de una cantidad eficaz de una composición descrita anteriormente. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano.

Otro aspecto de la invención es un uso en un método para tratar a un mamífero que tiene un tumor que sobre-expresa Cripto que comprende el uso en el mamífero de una composición descrita anteriormente en una cantidad eficaz. Una composición para su administración puede incluir excipientes farmacéuticamente aceptables, anticuerpos conjugados con agentes

25 30 quimioterapéuticos y anticuerpos administrados en combinación con agentes quimioterapéuticos no conjugados.

Los métodos de la invención son particularmente útiles para inhibir el crecimiento de células tumorales y/o tratar a un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que tiene un tumor donde la célula tumoral se selecciona entre

35 células tumorales de cerebro, la cabeza, el cuello y la próstata.

En otra realización más, la invención incluye métodos para determinar si un tejido expresa Cripto, que comprende la etapa de analizar el tejido del mamífero en un inmunoensayo usando cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. También se incluyen métodos para determinar si una línea celular sobre-expresa Cripto, que comprende la etapa de analizar la línea celular en un inmunoensayo usando cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para conservar o mantener la inhibición inducida por Activina B de una célula tumoral, que comprende exponer la célula tumoral a un anticuerpo de la invención. En ciertas realizaciones, la célula tumoral es una célula tumoral humana. En algunas realizaciones, la célula tumoral se selecciona entre células tumorales de cerebro.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método para identificar un compuesto que es capaz de bloquear la interacción entre Cripto y Activina B, que comprende las etapas de poner en contacto Cripto y Activina B en presencia de un compuesto candidato y detectar un cambio en la interacción entre Cripto y Activina B. En algunas realizaciones, el compuesto es un anticuerpo.

Estos y otros aspectos de la invención se exponen en mayor detalle a continuación en la Descripción Detallada de la Invención.

Descripción Detallada de la Invención

Esta invención se basa en el descubrimiento de que ciertos anticuerpos específicos de Cripto pueden afectar a la actividad de Cripto, por ejemplo, inhibiendo la interacción entre Cripto y ALK4 y/o la interacción entre Cripto y Activina B, y pueden usarse para inhibir el crecimiento de células tumorales. Algunos de estos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo en el dominio de unión ligando/receptor de una proteína Cripto nativa o una forma desnaturalizada de Cripto. Por ejemplo, pueden unirse a un dominio tipo EGF, un dominio cys-rico, o un péptido (por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 aminoácidos) de la región que abarca los restos aminoacídicos 46 a 150 de Cripto.

Los anticuerpos de esta invención son útiles en la terapia de tumores malignos o benignos de mamíferos en los que el crecimiento del tumor es al menos parcialmente dependiente de Cripto. Este crecimiento habitualmente

tiene una tasa de crecimiento anormal que está en exceso de la necesaria para la homeostasis normal y está en exceso de la de tejidos normales del mismo origen.

I. DEFINICIONES

5 Se hacen diversas definiciones en todo este documento. La mayoría de las palabras tienen el significado que se atribuiría a esas palabras por un especialista en la técnica. Las palabras definidas específicamente a continuación o en otra parte de este documento tienen el significado proporcionado en el contexto de la invención como un conjunto y son como
10 comprenden típicamente los especialistas en la técnica.

 Como se usa en este documento, "región" significa una parte físicamente contigua de la estructura primaria de una biomolécula. En el caso de proteínas, una región se define por una parte contigua de la secuencia de aminoácidos de esa proteína.

15 Como se usa en este documento, "dominio" significa una parte estructural de una biomolécula que contribuye a una función conocida o sospechada de la biomolécula. Los dominios pueden ser co-extensivos con regiones o partes de los mismos; los dominios también pueden incorporar una parte de una biomolécula que es distinta de una región particular, en adición a
20 toda o parte de esa región. Los ejemplos de dominios proteicos incluyen, aunque sin limitación, el dominio extracelular (abarca desde aproximadamente el resto 31 hasta aproximadamente el resto 188 de Cripto, incluyendo CR-1 (SEC ID N° 1) y CR-3 (SEC ID N° 2)) y el dominio transmembrana (abarca desde aproximadamente el resto 169 hasta aproximadamente el resto 188 de
25 Cripto, incluyendo CR-1 y CR-3). Un dominio de unión ligando/receptor de la proteína Cripto abarca desde aproximadamente el resto 75 hasta aproximadamente el resto 150 de Cripto, incluyendo CR-1 y CR-3; este dominio incluye el dominio tipo EGF, que abarca, por ejemplo, desde aproximadamente el resto 75 hasta aproximadamente el resto 112 de Cripto, incluyendo CR-1 y
30 CR-3, y el dominio cys-rico, que abarca, por ejemplo, desde aproximadamente el resto 114 hasta aproximadamente el resto 150 de Cripto, incluyendo CR-1 y CR-3. Muchos anticuerpos monoclonales de la invención se identificaron como de unión al dominio tipo EGF o cys-rico. Además, los anticuerpos monoclonales A10B2.18 (N° DE ACCESO A LA ATCC PTA-3311), B3F6.17 (N° DE ACCESO
35 A LA ATCC PTA-3319) y A17A2.16 se han identificado como de unión a un

epítopo formado en un dominio en la región que abarca los restos aminoacídicos 46-62 de Cripto cadena arriba del dominio tipo EGF. Véase el Ejemplo 3 a continuación.

Un epítopo al que se une el anticuerpo anti-Cripto de la invención puede estar presente en la proteína Cripto conformacionalmente nativa o la proteína Cripto desnaturalizada. Además, puede formarse un epítopo por secuencias no contiguas en el polipéptido Cripto.

Como se usa en este documento, un anticuerpo de esta invención puede ser, por ejemplo, un anticuerpo murino, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, o un anticuerpo quimérico. Puede ser un anticuerpo completo (es decir, con dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa) de cualquier isotipo y subtipo (por ejemplo, IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 y IgA2; con la cadena ligera kappa o lambda). Como alternativa, el anticuerpo de esta invención se refiere a un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, y Fv de cadena sencilla) de un anticuerpo completo.

Cualquiera de los anticuerpos de la invención puede conjugarse opcionalmente a un agente quimioterapéutico, como se define a continuación.

Como se usa en este documento, "un anticuerpo capaz de internalizar Cripto" significa un anticuerpo que accede a la célula eliminando al mismo tiempo Cripto de la superficie celular. Se pueden seleccionar anticuerpos contra Cripto que son capaces de internalizar Cripto, por ejemplo, usando anticuerpos monoclonal contra Cripto marcados de forma fluorescente. Para determinar qué anticuerpos pueden internalizarse en las células Cripto positivas, se puede ensayar la captación de la señal fluorescente de los anticuerpos marcados en las células observando las células en un microscopio fluorescente y/o confocal. Aquellos anticuerpos que se internalizan se observarán como señales fluorescentes en las vesículas citoplasmáticas y/o celulares. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos contra Cripto capaces de internalizar Cripto incluyen A27F6.1, B3F6.17 y 1-1A4C.2.

Como se usa en este documento, "compuesto" significa cualquier agente químico o molécula identificable incluyendo, aunque sin limitación, iones, átomos, moléculas pequeñas, péptidos, proteínas, azúcares, nucleótidos, y ácidos nucleicos. Dicho compuesto puede ser natural o sintético.

Como se usa en este documento, "modular" o "modificar" significa un

aumento o disminución en la cantidad, calidad, o efecto de una actividad particular o proteína.

Como se usa en este documento, "inhibir" significa una disminución en la cantidad, calidad o efecto de una actividad particular o proteína.

5 Como se usa en este documento, "modular la actividad Cripto" significa un aumento o disminución en la cantidad, calidad, o efecto de la actividad Cripto. El aumento o disminución en la cantidad, calidad, o efecto de la actividad Cripto puede ser en al menos aproximadamente, por ejemplo, el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100%. También se
10 visualizan aumentos mayores de aproximadamente el 100%, por ejemplo, de al menos aproximadamente factor 3, 4, 5, 10, 20 o más. La actividad puede medirse por ensayos conocidos en la técnica, tales como el ensayo de células nulas mostrado en el Ejemplo 3. En algunas realizaciones, la interacción proteica entre Cripto y otra proteína se inhibe mediante la unión de los
15 anticuerpos de la invención.

 Como se usa en este documento, "bloqueo de la interacción entre Cripto y ALK4" o "modulación de la interacción entre Cripto y ALK4" significa un aumento o disminución en la interacción, es decir, unión, entre Cripto y ALK4. El aumento o disminución en la interacción puede ser en al menos
20 aproximadamente, por ejemplo, el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100%. También se visualizan aumentos mayores de aproximadamente el 100%, por ejemplo, de aproximadamente factor 3, 4, 5, 10, 20 o más. La actividad puede medirse por ensayos conocidos en la técnica, tales como el ensayo de unión mostrado en el Ejemplo 8.

25 Como se usa en este documento, "bloqueo de la interacción entre Cripto y Activina B" o "modulación de la interacción entre Cripto y Activina B" significa un aumento o disminución en la interacción, es decir, unión, entre Cripto y Activina B. El aumento o disminución en la interacción puede ser en al menos aproximadamente, por ejemplo, el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,
30 80%, 90%, o 100%. También se visualizan aumentos mayores de aproximadamente el 100%, por ejemplo, de aproximadamente factor 3, 4, 5, 10, 20 o más. La actividad puede medirse por ensayos conocidos en la técnica, tales como el ensayo de unión mostrado en el Ejemplo 11.

 Como se usa en este documento, "modular el crecimiento de células
35 tumorales *in vitro*" significa un aumento o disminución en la cantidad de células

tumorales *in vitro*. El aumento o disminución en la cantidad de células tumorales puede ser en al menos aproximadamente, por ejemplo, el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100%. Se visualizan aumentos mayores de aproximadamente el 100%, por ejemplo, de aproximadamente factor 3, 4, 5, 10, 20 o más. La modulación *in vitro* del crecimiento de células tumorales puede medirse por ensayos conocidos en la técnica, tales como el ensayo en agar blando de células GEO mostrado en el Ejemplo 4.

Como se usa en este documento, "modular el crecimiento de células tumorales *in vivo*" significa una disminución en la cantidad, angiogénesis, y/o metástasis de células tumorales *in vivo*. La disminución en la cantidad de células tumorales puede ser en al menos aproximadamente, por ejemplo, el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100%. La modulación *in vivo* del crecimiento de células tumorales puede medirse por ensayos conocidos en la técnica, tales como el mostrado en el Ejemplo 5.

Como se usa en este documento, "efecto terapéutico" significa la inhibición de un estado anormal. Un efecto terapéutico alivia a algún grado uno o más de los síntomas del estado anormal. En referencia al tratamiento de estados anormales, un efecto terapéutico puede referirse a uno o más de los siguientes: (a) un aumento o disminución en la proliferación, crecimiento, y/o diferenciación de células; (b) inhibición (es decir, ralentización o detención) o promoción (es decir, aumento o inicio) de la muerte celular; (c) inhibición de la degeneración; (d) alivio a algún grado de uno o más de los síntomas asociados con el estado anormal; y (e) potenciación de la función de una población de células. Los compuestos que demuestran eficacia contra estados anormales pueden identificarse como se describe en este documento.

Como se usa en este documento, "administración" significa un método para incorporar un compuesto en células o tejidos de un organismo. El estado anormal puede evitarse o tratarse cuando las células o tejidos del organismo existen dentro del organismo (*in vivo*) o fuera del organismo (*ex vivo*). Las células que existen fuera del organismo pueden mantenerse o cultivarse en placas de cultivo celular, o en otro organismo. Para células mantenidas dentro del organismo, existen muchas técnicas en la técnica para administrar compuestos, incluyendo (aunque sin limitación) aplicaciones orales, parenterales, dérmicas, en inyección, y en aerosol. Para células fuera del organismo, existen múltiples técnicas en la técnica para administrar los

compuestos, incluyendo (aunque sin limitación) técnicas de microinyección de células, técnicas de transformación y técnicas de transporte. La administración puede conseguirse por los muchos modos conocidos en la técnica, por ejemplo, oral, intravenoso, intraperitoneal, intramuscular, y similares. Cuando se usan en terapia *in vivo*, los anticuerpos de la invención se administran a un paciente en cantidades eficaces. Como se usa en este documento, una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para ocasionar los resultados clínicos beneficiosos o deseados (es decir, cantidades que eliminan o reducen la carga tumoral del paciente). Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Para propósitos de esta invención, una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención es una cantidad del anticuerpo que es suficiente para mejorar, estabilizar, prevenir o retardar el desarrollo de la patología asociada a Cripto o activina B, particularmente los tumores asociados a Cripto o activina B.

Un ejemplo de un régimen de tratamiento típico incluye administrar por infusión intravenosa los anticuerpos de la invención en un programa semanal a una dosis de aproximadamente 2-5 mg/kg. Los anticuerpos se administran en una unidad de quimioinfusión para pacientes externos, salvo que el paciente requiera hospitalización. También se incluyen otros regímenes de administración conocidos en la técnica.

El estado anormal también puede prevenirse o tratarse administrando un anticuerpo de la invención a un grupo de células que tienen una aberración en una vía de transducción de señales para un organismo. Después puede controlarse el efecto de la administración de un compuesto sobre la función del organismo. El organismo es preferiblemente un ser humano.

Como se usa en este documento, "sobre-expresión de Cripto" significa la expresión de Cripto por un tejido o célula cuya expresión es mayor (por ejemplo, en al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, o incluso en al menos aproximadamente factor 2, 3, 4, 5, o 10) que la expresión de Cripto de tejido o células normales en una cantidad estadísticamente significativa.

Como se usa en este documento, "agente quimioterapéutico" significa cualquier agente identificado en la técnica como que tiene efecto terapéutico sobre la inhibición del crecimiento tumoral, el mantenimiento del crecimiento tumoral inhibido, y/o la inducción de la remisión, tal como compuestos

naturales, compuestos sintéticos, proteínas, proteínas modificadas, y compuestos radiactivos. Los agentes quimioterapéuticos incluidos por la presente incluyen agentes que pueden conjugarse a los anticuerpos de la invención o como alternativa agentes que pueden usarse en combinación con
 5 los anticuerpos de la invención sin conjugarse al anticuerpo. Los agentes quimioterapéuticos ejemplares que pueden conjugarse a los anticuerpos de la invención incluyen, aunque sin limitación radioconjugados (^{90}Y , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{186}Rh , etc.), profármacos activados por tumor (maytansinoides, análogos de CC-1065, derivados de calicheamicina, antraciclinas, alcaloides de la vinca, etc.), ricina, toxina diftérica, y exotoxina de pseudomonas.
 10

Los agentes quimioterapéuticos pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención, en lugar de conjugarse a los mismos (es decir, agentes quimioterapéuticos no conjugados), e incluyen, aunque sin limitación los siguientes: platinos (es decir, cis-platino), antraciclinas, análogos
 15 nucleosídicos (purina y pirimidina), taxanos, camptotecinas, epipodofilotoxinas, agentes alquilantes del ADN, antagonistas de folato, alcaloides de la vinca, inhibidores de la ribonucleótido reductasa, inhibidores de estrógenos, inhibidores de progesterona, inhibidores de andrógenos, inhibidores de aromatasa, interferones, interleuquinas, anticuerpos monoclonales, taxol, camptosar, adriamicina (dox), 5-FU y gemcitabina. Dichos agentes
 20 quimioterapéuticos pueden emplearse en la práctica de la invención en combinación con los anticuerpos de la invención por administración coadyuvante del anticuerpo y el agente quimioterapéutico no conjugado.

Como se usa en este documento, "vehículo o excipiente
 25 farmacéuticamente aceptable" significa compuestos biológicamente inertes conocidos en la técnica y empleados en la administración de los anticuerpos de la invención. Los vehículos aceptables son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., 1990. Los vehículos aceptables pueden incluir sales
 30 biocompatibles, inertes o bioabsorbibles, agentes tamponantes, oligosacáridos, o polisacáridos, polímeros, un compuesto viscoelástico tal como ácido hialurónico, agentes que mejoran la viscosidad, conservantes, y similares.

II. ANTICUERPOS DE LA INVENCION

Los anticuerpos de la invención se unen específicamente a Cripto. Como
 35 se usa en este documento, Cripto incluye la proteína Cripto CR-1, la proteína

Cripto CR-3, y fragmentos de las mismas. Dichos fragmentos pueden ser dominios completos, tales como los dominios extracelulares o intracelulares, el dominio tipo EGF, el dominio cys-rico, el dominio de unión al receptor, y similares. Dichos fragmentos también pueden incluir epítomos contiguos y no contiguos en cualquier dominio de la proteína Cripto. Los ejemplos de antígenos usados para crear anticuerpos específicos para Cripto incluyen, aunque sin limitación, CR40 (SEC ID N° 3), CR41 (SEC ID N° 4), CR43 (SEC ID N° 5), CR44 (SEC ID N° 6), CR49 (SEC ID N° 7), CR50 (SEC ID N° 8) y CR51 (SEC ID N° 9), cuyas secuencias de aminoácidos se proporcionan en el Ejemplo 2.

La secuencia de 188 aminoácidos para CR-1 es la siguiente (SEC ID N° 1):

MDCRKMARFSYSVIWIMAISKVPELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDS
IWPQEEPAIRPRSSQRVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPS
FYGRNCEHDVRKENC GSVP HDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCD
GLVKDEHLVASRTPELPPSARTTTFMLVGICLSIQSYY

La secuencia de 188 aminoácidos para CR-3 es la siguiente (SEC ID N° 2):

MDCRKMVRFSYSVIWIMAISKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGDLA FRDDS
IWPQEEPAIRPRSSQRVLP MGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLE SFCACPPS
FYGRNCEHDVRKENC GSVP HDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCD
GLVMDEHLVASRTPELPPSARTTTFMLAGICLSIQSYY

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen a un epítomo en el dominio tipo EGF de Cripto. El dominio tipo EGF abarca desde aproximadamente el resto aminoacídico 75 hasta aproximadamente el resto aminoacídico 112 de la proteína Cripto madura. Los epítomos en el dominio tipo EGF pueden comprender tramos lineales o no lineales de restos aminoacídicos. Los ejemplos de epítomos lineales incluyen, aunque sin limitación, aproximadamente los restos 75-85, 80-90, 85-95, 90-100, 95-105, 100-110, o 105-112. En algunas realizaciones, el epítomo en el dominio EGF es un epítomo formado en la proteína Cripto conformacionalmente nativa frente a una proteína Cripto desnaturalizada.

En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen a un epítomo en el dominio cys-rico de Cripto. El dominio cys-rico abarca desde

aproximadamente el resto aminoacídico 114 hasta aproximadamente el resto aminoacídico 150 de la proteína Cripto madura. Los epítomos en el dominio cys-rico pueden comprender tramos lineales o no lineales de restos aminoacídicos. Los ejemplos de epítomos lineales incluyen, aunque sin
 5 limitación, aproximadamente los restos 114-125, 120-130, 125-135, 130-140, 135-145, o 140-150. En ciertas realizaciones, el epítomo en el dominio cys-rico es un epítomo formado en la proteína Cripto conformacionalmente nativa frente a una proteína Cripto desnaturalizada.

Una vez se han generado los anticuerpos, puede ensayarse la unión de
 10 los anticuerpos a Cripto usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como ELISA, mientras que la presencia de Cripto en una superficie celular puede ensayarse usando citometría de flujo (FACS), como se muestra en el Ejemplo 2. Como alternativa puede usarse cualquier otra técnica para medir dicha unión.

Esta invención proporciona anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos
 15 monoclonales y policlonales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos, anticuerpos bifuncionales/biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, y anticuerpos de región determinante de complementariedad (CDR) injertada, incluyendo compuestos que incluyen
 20 secuencias de CDR que reconocen específicamente un polipéptido de la invención) específicos para Cripto o fragmentos de la misma. Las expresiones "específico" y "selectivo", cuando se usan para describir la unión de los anticuerpos de la invención, indican que las regiones variables de los anticuerpos de la invención reconocen y se unen a polipéptidos Cripto. Se
 25 entenderá que los anticuerpos específicos de la invención también pueden interaccionar con otras proteínas (por ejemplo, proteína A de *S. aureus* u otros anticuerpos en técnicas ELISA) a través de interacciones con secuencias fuera de las regiones variables de los anticuerpos y, en particular, en las regiones constantes de la molécula.

Los ensayos de exploración para determinar la especificidad de unión de
 30 un anticuerpo de la invención (por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo en el dominio de unión ligando/receptor o el dominio que abarca los restos aminoacídicos 46-62) son bien conocidos y practicados de forma rutinaria en la técnica. Para un análisis global de dichos
 35 ensayos, véase Harlow et al. (Eds.), Antibodies A Laboratory Manual; Cold

Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Capítulo 6. Los anticuerpos que reconocen y se unen a fragmentos de la proteína Cripto también se incluyen, con la condición de que los anticuerpos sean específicos para polipéptidos Cripto. Los anticuerpos de la invención pueden producirse usando cualquier método bien conocido y practicado de forma rutinaria en la técnica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo en el dominio de unión ligando/receptor de Cripto. La especificidad del anticuerpo se describe en mayor detalle a continuación. Sin embargo, debe enfatizarse que los anticuerpos que pueden generarse a partir de otros polipéptidos que se han descrito previamente en la bibliografía y que son capaces de reaccionar de forma cruzada fortuitamente con Cripto (por ejemplo, debido a la existencia fortuita de un epítopo similar en ambos polipéptidos) se consideran anticuerpos "de reactividad cruzada". Dichos anticuerpos de reactividad cruzada no son anticuerpos que sean "específicos" para Cripto. La determinación de si un anticuerpo se une específicamente a un epítopo de Cripto se hace usando cualquiera de varios ensayos, tales como ensayos de transferencia de western, que son bien conocidos en la técnica. Para identificar las células que expresan Cripto y también para inhibir la actividad de unión ligando/receptor de Cripto, son particularmente útiles anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo extracelular de la proteína Cripto (es decir, partes de la proteína Cripto encontradas fuera de la célula).

La invención también proporciona una composición libre de células que comprende anticuerpos policlonales, en la que al menos uno de los anticuerpos es un anticuerpo de la invención. El antisuero aislado de un animal es una composición ejemplar, ya que es una composición que comprende una fracción de anticuerpos de un antisuero que se ha resuspendido en agua o en otro diluyente, excipiente, o vehículo.

En otras realizaciones, la invención proporciona anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítomos, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Los anticuerpos monoclonales

son útiles para mejorar la selectividad y especificidad de métodos de ensayo diagnóstico y analítico usando la unión antígeno-anticuerpo. Otra ventaja de los anticuerpos monoclonales es que se pueden sintetizar por células cultivadas tales como hibridomas, no contaminados por otras inmunoglobulinas. Las
 5 células recombinantes e hibridomas que producen dichos anticuerpos también se entienden como aspectos de la invención. Véanse también los siguientes análisis.

En otras realizaciones relacionadas más, la invención proporciona un anticuerpo anti-idiotipo específico para un anticuerpo que es específico para
 10 Cripto. Para un análisis más detallado de anticuerpo anti-idiotipo véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 6.063.379 y 5.780.029.

Es bien sabido que los anticuerpos contienen dominios de unión a antígeno relativamente pequeños que pueden aislarse químicamente o por técnicas recombinantes. Dichos dominios son moléculas de unión a Cripto
 15 útiles en sí mismas, y también pueden reintroducirse en anticuerpos humanos, o fusionarse a un agente quimioterapéutico o polipéptido. Por tanto, en otra realización más, la invención proporciona un polipéptido que comprende un fragmento de un anticuerpo específico para Cripto, en el que el fragmento y la molécula asociada, si la hay, se unen a Cripto. A modo de ejemplo no limitante,
 20 la invención proporciona polipéptidos que son anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos de CDR injertada. Para un análisis más detallado de anticuerpos de CDR injertada véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.859.205 y el siguiente análisis.

En otras realizaciones, pueden humanizarse anticuerpos no humanos
 25 por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanizados son útiles para aplicaciones terapéuticas *in vivo*. Además, pueden sintetizarse anticuerpos "humanizados" recombinantes. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos inicialmente obtenidos de un mamífero no humano en el que se ha usado tecnología de ADN recombinante
 30 para sustituir alguno o todos los aminoácidos no necesarios para la unión a antígeno por aminoácidos de las regiones correspondientes de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humana. Es decir, son quimeras que comprenden secuencias de inmunoglobulina en su mayor parte humanas en las que se han remplazado las regiones responsables de la unión específica a
 35 antígeno.

Pueden producirse diversas formas de anticuerpos usando técnicas de ADN recombinante convencionales (Winter y Milstein, 1991, Nature 349:293-99). Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de esta invención pueden generarse por la tecnología de hibridoma bien conocida. Por ejemplo, pueden

5 inmunizarse animales (por ejemplo, ratones, ratas o conejos) con preparaciones de Cripto purificadas o brutas, células transfectadas con construcciones de ADNc que codifican Cripto, células que expresan de forma constitutiva Cripto, y similares. Además, el antígeno puede suministrarse en forma de una proteína purificada, proteína expresada en células, fragmento

10 proteico o péptido del mismo, o en forma de un ADN desnudo o vectores virales que codifican la proteína, fragmento proteico, o péptido. Después se ensayan los sueros de los animales inmunizados para la presencia de anticuerpos anti-Cripto. Se aíslan las células B de los animales que dieron positivo en el ensayo, y se crean hibridomas con estas células B.

15 Los anticuerpos secretados por los hibridomas se exploran para su capacidad de unirse específicamente a Cripto (por ejemplo, unirse a células transfectadas con Cripto y no a células parentales no transfectadas) y para cualquier otra característica deseada, por ejemplo, tener las secuencias consenso de CDR deseadas, inhibir (o no en el caso de no bloqueantes) la

20 unión entre Cripto y ALK4 o entre Cripto y Activina B.

Las células de hibridoma que dan positivo en el ensayo en los ensayos de exploración se cultivan en un medio nutriente en condiciones que permiten que las células secreten los anticuerpos monoclonales en el medio de cultivo. El sobrenadante del cultivo de hibridoma condicionado después se recoge y se

25 purifican los anticuerpos contenidos en el sobrenadante. Como alternativa, el anticuerpo deseado puede producirse inyectando las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un animal no inmunizado (por ejemplo, un ratón). Las células de hibridoma proliferan en la cavidad peritoneal, secretando el anticuerpo que se acumula en forma de fluido ascítico. El anticuerpo puede

30 después recogerse extrayendo el fluido ascítico de la cavidad peritoneal con una jeringa.

Los anticuerpos monoclonales también pueden generarse aislando los ADNc que codifican el anticuerpo de los hibridomas deseados, transfectando células hospedadoras de mamífero (por ejemplo, células CHO o NSO) con los

35 ADNc, cultivando las células hospedadoras transfectadas, y recuperando el

anticuerpo del medio de cultivo.

Los anticuerpos monoclonales de esta invención también pueden generarse diseñando un anticuerpo de hibridoma afín (por ejemplo, murino, de rata o conejo). Por ejemplo, puede alterarse un anticuerpo afín por tecnología de ADN recombinante de modo que parte o toda la región bisagra y/o constante de las cadenas pesada y/o ligera se remplacen con los componentes correspondientes de un anticuerpo de otra especie (por ejemplo, ser humano). Generalmente, los dominios variables del anticuerpo diseñado permanecen idénticos o sustancialmente idénticos a los dominios variables del anticuerpo afín. Dicho anticuerpo diseñado se llama un anticuerpo quimérico y es menos antigénico que el anticuerpo afín cuando se administra a un individuo de la especie de la que se obtuvo la región bisagra y/o constante (por ejemplo, un ser humano). Los métodos para crear anticuerpos quiméricos son bien conocidos en la técnica. Las regiones constantes humanas incluyen aquellas derivadas de IgG1 e IgG4.

Los anticuerpos monoclonales de esta invención también incluyen anticuerpos completamente humanos. Pueden prepararse usando esplenocitos humanos cebados in vitro, como se describe por Boerner et al., 1991, J. Immunol. 147:86-95, o usando bibliotecas de anticuerpos presentadas por fagos, como se describe en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.300.064.

Como alternativa, los anticuerpos completamente humanos pueden prepararse por clonación de repertorio como se describe por Persson et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2432-36; y Huang y Stollar, 1991, J. Immunol. Methods 141:227-36. Además, la Patente de Estados Unidos 5.798.230 describe la preparación de anticuerpos monoclonales humanos a partir de células B humanas, en la que se immortalizan células B productoras de anticuerpos humanos por infección con un virus Epstein-Barr, o un derivado del mismo, que expresa el antígeno nuclear 2 de Epstein-Barr (EBNA2), una proteína necesaria para la immortalización. La función de EBNA2 posteriormente se desactiva, provocando un aumento en la producción de anticuerpo.

Algunos otros métodos para producir anticuerpos completamente humanos implican el uso de animales no humanos que tienen loci Ig endógenos inactivados y son transgénicos para los genes de cadena pesada y

ligera del anticuerpo humano no reordenados. Dichos animales transgénicos pueden inmunizarse con Cripto e hibridomas creados a partir de células B obtenidas de los mismos. Estos métodos se describen en, por ejemplo, las diversas publicaciones/patentes de GenPharm/Medarex (Palo Alto, CA) que se refieren a ratones transgénicos que contienen miniloci Ig humanos (por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.789.650); las diversas publicaciones/patentes de Abgenix (Fremont, CA) con respecto a XENOMICE™ (por ejemplo, Patentes de Estados Unidos 6.075.181, 6.150.584 y 6.162.963; Green et al., 1994, Nature Genetics 7:13-21; y Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146-56); y las diversas publicaciones/patentes Kirin (Japón) que se refieren a ratones "transómicos" (por ejemplo, documento EP 843 961, y Tomizuka et al., 1997, Nature Genetics 16:1433-43). Véase también, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.569.825, los documentos WO00076310, WO00058499 y WO00037504.

Los anticuerpos monoclonales de esta invención también incluyen versiones humanizadas de anticuerpos anti-Cripto afines derivados de otras especies. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo producido por tecnología de ADN recombinante, en la que algunos o todos los aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humana que no son necesarios para la unión a antígeno (por ejemplo, las regiones constantes y las regiones flanqueantes de los dominios variables) se usan para sustituirse por los aminoácidos correspondientes de la cadena ligera o pesada del anticuerpo no humano afín. A modo de ejemplo, una versión humanizada de un anticuerpo murino contra un antígeno dado tiene tanto en su cadena pesada como en la ligera (1) regiones constantes de un anticuerpo humano; (2) regiones flanqueantes de los dominios variables de un anticuerpo humano; y (3) las CDR del anticuerpo murino. Cuando sea necesario, pueden cambiarse uno o más restos en las regiones flanqueantes humanas por restos en las posiciones correspondientes en el anticuerpo murino para conservar la afinidad de unión del anticuerpo humanizado al antígeno. Este cambio a veces se llama "mutación inversa". Los anticuerpos humanizados generalmente tienen menor probabilidad de provocar una respuesta inmune en seres humanos en comparación con anticuerpos humanos quiméricos porque los primeros contienen considerablemente menos componentes no humanos.

Los métodos para crear anticuerpos humanizados se describen en, por

ejemplo, Winter documento EP 239 400; Jones et al., 1986, Nature 321:522-25; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-27 (1988); Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-36; Queen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-33; Patente de Estados Unidos 6.180.370; y Orlandi et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-37. Véase también, por ejemplo, la Solicitud de Patente PCT N° 94/04679. Pueden producirse anticuerpos primatizados de forma similar usando genes de anticuerpos de primate (por ejemplo, mono rhesus, babuino y chimpancé). Después pueden introducirse cambios adicionales en la región flanqueante del anticuerpo para modular la afinidad o la inmunogenicidad. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762, y 6.180.370.

Generalmente, el transplante de CDR murinas (o de otro animal no humano) en un anticuerpo humano se consigue del siguiente modo. Los ADNc que codifican los dominios variables de cadena pesada y ligera se aíslan de un hibridoma. Las secuencias de ADN de los dominios variables, incluyendo las CDR, se determinan por secuenciación. Los ADN que codifican las CDR se transfieren a las regiones correspondientes de una secuencia que codifica el dominio variable de cadena pesada o ligera de anticuerpo humano por mutagénesis dirigida al sitio. Después se añaden los segmentos génicos de la región constatable humana de un isotipo deseado (por ejemplo, $\gamma 1$ para CH y κ para CL). Los genes de cadena pesada y ligera humanizadas se co-expresan en células hospedadoras de mamífero (por ejemplo, células CHO o NSO) para producir anticuerpo humanizado soluble. Para facilitar la producción a gran escala de anticuerpos, a menudo es deseable producir dichos anticuerpos humanizados en biorreactores que contienen las células que expresan el anticuerpo, o producir mamíferos transgénicos (por ejemplo, cabras, vacas, u ovejas) que expresen el anticuerpo en la leche (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.827.690).

A veces, la transferencia directa de las CDR a una región flanqueante humana conduce a una pérdida de afinidad de unión al antígeno del anticuerpo resultante. Esto es porque en algunos anticuerpos afines, ciertos aminoácidos dentro de las regiones flanqueantes interaccionan con las CDR y por tanto influyen en la afinidad de unión global al antígeno del anticuerpo. En dichos casos, deben introducirse "mutaciones inversas" (*supra*) en las regiones flanqueantes del anticuerpo aceptor para retener la actividad de unión al

antígeno del anticuerpo afín.

El enfoque general para crear mutaciones inversas es conocido en la técnica. Por ejemplo Queen, et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-33, Co et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869-73, y el documento WO 5 90/07861 (Protein Design Labs Inc.) describen un enfoque que implica dos etapas clave. Primero, se eligen las regiones flanqueantes V humanas por análisis informático para la homología de secuencia proteica óptima con la región flanqueante de la región V del anticuerpo murino afín. Después, se modela por ordenador la estructura terciaria de la región V murina para 10 visualizar los restos aminoacídicos flanqueantes que tienen probabilidad de interaccionar con las CDR murinas, y estos restos aminoacídicos murinos después se superponen sobre las región flanqueante humana homóloga.

En este enfoque de dos etapas, hay varios criterios para diseñar anticuerpos humanizados. El primer criterio es usar como aceptor humano la 15 región flanqueante de una inmunoglobulina humana particular que habitualmente es homóloga a la inmunoglobulina donante no humana, o usar una región flanqueante consenso de muchos anticuerpos humanos. El segundo criterio es usar el aminoácido donante en lugar del aceptor si el resto aceptor humano es inusual y el resto donante es típico para secuencias humanas en un 20 resto específico de la región flanqueante. El tercer criterio es usar el resto aminoacídico flanqueante donante en lugar del aceptor en posiciones inmediatamente adyacentes a las CDR.

También se puede usar un enfoque diferente como se describe en, por ejemplo, Tempest, 1991, Biotechnology 9: 266-71. En este enfoque, se usan 25 las regiones flanqueantes de la región V derivadas de las cadenas pesada y ligera NEWM y REI, respectivamente, para el injerto de CDR sin introducción radical de restos murinos. Una ventaja de usar este enfoque es que las estructuras tridimensionales de las regiones variables de NEWM y REI son conocidas a partir de cristalografía de rayos X y por tanto pueden modelarse 30 fácilmente las interacciones específicas entre las CDR y los restos flanqueantes de la región V.

El anticuerpo humanizado de esta invención puede contener una mutación (por ejemplo, delección, sustitución o adición) en una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) de ciertas posiciones en la cadena pesada de 35 modo que la función efectora del anticuerpo (por ejemplo, la capacidad de

unirse a un receptor Fc o un factor del complemento) se altere sin afectar a la capacidad del anticuerpo de unirse a Cripto (Patente de Estados Unidos 5.648.260). Estas posiciones de la cadena pesada incluyen, sin limitación, los restos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 (sistema de numeración EU). El anticuerpo humanizado puede, por ejemplo, contener las mutaciones L234A (es decir, remplazo de leucina en la posición 234 de un anticuerpo no modificado con alanina) y L235A (sistema de numeración EU) en su cadena pesada.

Además, el anticuerpo humanizado de esta invención puede contener una mutación (por ejemplo, delección o sustitución) en un resto aminoacídico que es un sitio para la glucosilación, de modo que se elimine el sitio de glucosilación. Dicho anticuerpo puede ser clínicamente beneficioso por tener reducidas las funciones efectoras u otras funciones no deseadas reteniendo al mismo tiempo su afinidad de unión a Cripto. Las mutaciones de los sitios de glucosilación también pueden ser beneficiosas para el desarrollo de procesos (por ejemplo, expresión y purificación de la proteína). Por ejemplo, la cadena pesada del anticuerpo puede contener la mutación N297Q (sistema de numeración EU) de modo que la cadena pesada ya no pueda glucosilarse en ese sitio.

En otras realizaciones más, las cadenas pesada y/o ligera del anticuerpo de esta invención contienen mutaciones que aumentan la afinidad de la unión a Cripto y de este modo aumentan la potencia para tratar trastornos mediados por Cripto.

Los anticuerpos monoclonales de esta invención pueden incluir adicionalmente otros restos para realizar o potenciar una función deseada. Por ejemplo, los anticuerpos pueden incluir un resto de toxina (por ejemplo, toxoide tetánico o ricina) o un radionúclido (por ejemplo, ^{111}In o ^{90}Y) para eliminar las células marcadas por los anticuerpos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.307.026). Los anticuerpos pueden incluir un resto (por ejemplo, biotina, restos fluorescentes, restos radiactivos, marca de histidina u otras marcas peptídicas) para facilitar el aislamiento o la detección. Los anticuerpos también pueden incluir un resto que puede prolongar su vida media en suero, por ejemplo, un resto de polietilenglicol (PEG), y un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas o fragmento del mismo (por ejemplo, una parte de la región constante de cadena pesada de IgG1 humana tal como las

regiones de bisagra, CH2 y CH3).

También pueden usarse fragmentos de anticuerpo y anticuerpos univalentes en los métodos y composiciones de esta invención. Los anticuerpos univalentes comprenden un dímero de cadena pesada/cadena ligera unido a la región Fc (o tronco) de una segunda cadena pesada. "Región Fab" se refiere a esas partes de las cadenas que son apenas equivalentes, o análogas, a las secuencias que comprenden las partes de ramificación Y de la cadena pesada y a la cadena ligera en su totalidad, y que colectivamente (en agregados) han demostrado mostrar actividad de anticuerpo. Una proteína Fab incluye agregados de una cadena pesada y una ligera (habitualmente conocidos como Fab') así como tetrámeros que corresponden a los dos segmentos de ramificación del Y del anticuerpo (habitualmente conocidos como F(ab)₂) esté cualquiera de los anteriores unido covalente o no covalentemente, siempre que la agregación sea capaz de reaccionar específicamente con un antígeno o familia de antígenos particular.

III. MODULACIÓN DE LAS SEÑALES

Los anticuerpos de la invención pueden inhibir la actividad de Cripto y/o las interacciones de Cripto con sus ligandos. La sobre-expresión de la actividad de Cripto puede conducir a un estado des-diferenciado que promueve las características celulares mesenquimáticas, la proliferación aumentada, y la migración celular (Salomon et al., 1999, BioEssays 21:61-70; Ciardiello et al., 1994, Oncogene 9:291-98; y Baldassarre et al., 1996, Int. J. Cancer 66:538-43), fenotipos asociados con la transformación celular observada en neoplasia.

Un método para ensayar la actividad de anticuerpos anti-Cripto y su capacidad de inhibir la actividad de Cripto es con una línea celular knock-out (KO) F9-Cripto (Minchiotti et al., 2000, Mech. Dev. 90:133-42). Cripto estimula la fosforilación de Smad2 y el factor de transcripción FAST en embriones de *Xenopus*, y la actividad del factor de transcripción FAST puede controlarse midiendo la actividad luciferasa a partir de un elemento regulador de FAST-gen informador de luciferasa (Saijoh et al., 2000, Mol. Cell 5:35-47). Las células KO F9-Cripto tienen mutaciones nulas en el gen Cripto y no pueden translucir la señalización dependiente de Cripto (Minchiotti et al., *supra*). La actividad de Cripto puede evaluarse en las células KO F9 Cripto transfectándolas con Cripto, FAST, y las construcciones de elemento regulador de FAST-gen de luciferasa. No se observará actividad FAST luciferasa dependiente de Cripto en

estas líneas celulares salvo que se introduzcan por transfección en las mismas el ADNc de Cripto y el ADNc de FAST. Los anticuerpos capaces de bloquear la señalización Nodal dependiente de Cripto son anticuerpos que bloquean la actividad Cripto.

5 Los especialistas en la técnica pueden emplear otros ensayos capaces de medir la actividad de Cripto, tales como el cultivo en un ensayo en agar blando (véase el Ejemplo 4 a continuación). La capacidad de las células de crecer en agar blando está asociada con la transformación celular y el ensayo es un ensayo *in vitro* clásico para medir la inhibición del crecimiento celular
10 tumoral. Otros ensayos útiles para determinar la inhibición e la actividad incluyen ensayos *in vitro* en plástico, y similares.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen a Cripto e inhiben las interacciones Cripto-Activina B. Se ha descubierto que Cripto puede unirse a Activina B e inhibir la vía de señalización de Activina B. La
15 activina B puede inhibir la proliferación de células tumorales (Risbridger et al., 2001, Endocr. Rev. 22:836-58). La unión de Cripto a Activina B también puede alterar la inhibición inducida por Activina B de la proliferación.

Un método para ensayar la actividad de anticuerpos anti-Cripto y su capacidad de inhibir las interacciones Cripto-Activina B es midiendo la
20 capacidad del anticuerpo de evitar la alteración mediada por Cripto de la inhibición inducida por Activina B de la proliferación. Uno de dichos métodos se describe en el Ejemplo 9. En el Ejemplo 11 se describe un método para ensayar directamente la capacidad de anticuerpos anti-Cripto de inhibir las interacciones Cripto-Activina B.

25 **IV. USOS TERAPÉUTICOS**

Los anticuerpos de la invención también son útiles para propósitos terapéuticos, tales como la inhibición del crecimiento celular tumoral, propósitos diagnósticos para detectar o cuantificar Cripto, y purificación de Cripto.

En algunas realizaciones de la invención, se proporcionan anticuerpos
30 que son capaces de unirse específicamente a Cripto y que inhiben el crecimiento de células tumorales en un paciente, especialmente cuando el crecimiento tumoral está mediado por la pérdida o disminución de la señalización de Activina B. En ciertas realizaciones, las células tumorales son células tumorales de cerebro, cabeza, cuello o próstata.

35 En otras realizaciones, se proporcionan anticuerpos que son capaces de

unirse específicamente a Cripto y que inhiben el crecimiento de células tumorales que sobre-expresan Cripto. En una realización, las células tumorales son líneas celulares que sobre-expresan Cripto, tales como líneas celulares derivadas de cáncer de cerebro.

5 Los anticuerpos anti-Cripto pueden explorarse para su actividad *in vivo* como agentes anti-cáncer potenciales siguiendo protocolos convencionales usados por los especialistas en la técnica, como se ilustra en el Ejemplo 4 a continuación. Se resumen ejemplos de dichos protocolos por el National Cancer Institute (NCI) en sus protocolos de "exploración de modelos de cáncer
10 *in vivo*", publicación NIH número 84-2635 (febrero de 1984).

En otras realizaciones de la invención, los anticuerpos de la invención se usan para tratar a un paciente que tiene un tumor canceroso.

Los anticuerpos de la invención pueden combinarse con un excipiente farmacéuticamente aceptable y administrarse en una dosis terapéuticamente
15 eficaz a un paciente. Para un análisis de los métodos para inhibir el crecimiento de tumores véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.165.464.

También se incluyen métodos para tratar a un mamífero que padece un trastorno asociado con elevados niveles de Cripto o niveles disminuidos de Activina B, donde el método comprende administrar al mamífero una cantidad
20 eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo en el dominio de unión ligando/receptor de Cripto, incluyendo, aunque sin limitación, cuando el epítipo está en un dominio tipo EGF o un dominio cys-rico de Cripto.

También se incluyen usos en el tratamiento de un mamífero que padece un trastorno asociado con elevados niveles de Cripto, donde el uso comprende
25 una cantidad eficaz de un anticuerpo que forma específicamente un complejo con Cripto y está dirigido al epítipo al que está dirigido un anticuerpo seleccionado entre el grupo compuesto por A8G3.5 (Nº DE ACCESO A LA ATCC PTA-3317).

El diagnóstico mediante la detección de Cripto se consigue fácilmente a
30 través de ensayos de unión convencionales usando los nuevos anticuerpos de la invención, que permite a los especialistas en la técnica detectar la presencia de Cripto específicamente en una amplia diversidad de muestras, cultivos, y similares.

También se abarcan kits que comprenden un anticuerpo de la invención
35 para cualquiera de los propósitos descritos en este documento. En general, un

kit también incluye un antígeno de control para el que el anticuerpo es inmuno-específico. Las realizaciones incluyen kits que comprenden todos los reactivos e instrucciones para su uso.

V. EJEMPLOS

- 5 Las características adicionales de la invención serán evidentes a partir de los siguientes Ejemplos. Debe entenderse que los siguientes Ejemplos son para propósitos de ilustración solamente, y no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención de ningún modo.

Ejemplo 1: Expresión y Purificación de Cripto

- 10 Se construyó un plásmido de expresión denominado pSGS480 subclonando un ADNc que codifica los restos aminoacídicos 1 a 169 de una proteína Cripto humana (aminoácidos 1-169 de la SEC ID N° 1), fusionado al dominio Fc de IgG₁ humana (es decir, "CR(del C)-Fc") en el vector pEAG1100. Para una descripción más detallada de este vector, véase la Solicitud de
- 15 Patente de Estados Unidos N° de serie 60/233.148, presentada el 18 de septiembre de 2000. El vector pEAG1100 es un derivado del plásmido pCMV-Sport-betagal de GIBCO-BRL Life Technologies, cuyo uso en transfecciones transitorias en CHO se descubrió por Schifferli et al., 1999, Focus 21:16. Se creó eliminando el fragmento NotI del gen informador de la beta-galactosidasa
- 20 del plásmido pCMV-Sport-Betagal (número de catálogo 10586-014) del siguiente modo: el plásmido se digirió con NotI y EcoRV, el fragmento estructural del vector NotI de 4,38 kb se purificó en gel y se ligó. El ADN ligado se introdujo por transformación en *E. coli* DH5 α competentes. Se aisló pEAG1100 como un plásmido que contenía el recombinante deseado de una
- 25 colonia única aislada. Se confirmó la secuencia de pEAG1100 que abarca el promotor, el polienlazador, y la señal de terminación de la transcripción.

- El plásmido pSGS480 se introdujo por transfección transitoria en células CHO y las células se cultivaron a 28°C durante 7 días. Se examinó la presencia de la proteína CR(del C)-Fc en estas células y los medios condicionados por
- 30 análisis de transferencia de western. Para el análisis de transferencia de western, los medios condicionados y las células de células transfectadas con Cripto se cometieron a SDS-PAGE en geles en gradiente del 4-20% en condiciones reductoras, se transfirieron electroforéticamente a nitrocelulosa, y se detectó la proteína de fusión Cripto con un conjugado de antisuero policlonal
- 35 de conejo creado contra un oligopéptido de 17 unidades de Cripto (que

comprende los restos 97-113 de la SEC ID N° 1)-hemocianina de lapa californiana (KLH). Después de centrifugación para retirar las células, el análisis de transferencia de western mostró que la proteína CR(del C)-Fc se secretaba de forma eficaz en los medios condicionados (sobrenadante). El
 5 sobrenadante se aplicó a Proteína A-Sepharose® (Pharmacia), y la proteína unida se eluyó con fosfato sódico 25 mM pH 2,8, NaCl 100 mM. La proteína eluida se neutralizó con fosfato sódico 0,5 M a pH 8,6, y se analizó para el contenido de proteína total a partir de mediciones de absorbancia a 240-340 nm, y para la pureza por SDS-PAGE. La proteína eluida se filtró a través de un
 10 filtro de 0,2 micrómetros, y se almacenó a -70°C.

Ejemplo 2: Generación y Exploración de Anticuerpos

La proteína CR(del C)-Fc eluida, así como otros polipéptidos Cripto, se inyectan en ratones, y se usan técnicas convencionales conocidas para los especialistas en la técnica para generar hibridomas y anticuerpos
 15 monoclonales.

A. Generación de Anticuerpos

Se inmunizaron ratones Robertsonianos hembra (Jackson Labs) por vía intraperitoneal con 25 µg de CR(del C)-Fc humana purificada emulsionada con adyuvante completo de Freund ("FCA"; GibcoBRL n° 15721-012). Se
 20 estimularon dos veces por vía intraperitoneal (IP) con 25 µg de CR(del C)-Fc emulsionada con adyuvante incompleto de Freund ("FIA"; GibcoBRL n° 15720-014) y una vez en perlas de Proteína A. Los sueros se exploraron y 3 semanas después de la última estimulación, el ratón con el mayor título se estimuló por vía intraperitoneal con 50 µg de CR(del C)-Fc soluble tres días antes de la
 25 fusión. El ratón se estimuló por vía intravenosa (IV) con 50 µg de CR(del C)-Fc el día antes de la fusión.

Se fusionaron células esplénicas de ratón con células de mieloma FL653 a una proporción de 1 de bazo:6 de mieloma y se sembraron a 100.000, 33.000 y 11.000 células por pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos en medio
 30 de selección. Los pocillos positivos para el cultivo se exploraron por FACS y ELISA una semana después. Se realizaron dos fusiones.

B. Exploración de Anticuerpos

Los sobrenadantes resultantes de la primer o segunda fusión se exploraron primero en placas ELISA para el reconocimiento de proteínas
 35 Cripto(del C) y/o dominio tipo EGF de Cripto. Se depositó una proteína de

fusión de control (LT-receptor beta-Fc) sobre placas ELISA para descartar anticuerpos monoclonales que reconocían el epítipo Fc humano. El ELISA se realizó como se describe a continuación en la sección C. En la primera fusión, también se exploraron los sobrenadantes primarios por FACS para su capacidad de reconocer la proteína Cripto de superficie celular sobre la línea celular de tumor testicular NCCIT. En el caso de la segunda fusión, se analizó la capacidad de los sobrenadantes de reconocer Cripto sobre dos líneas celulares tumorales, NCCIT y la línea de cáncer de mama, DU4475, por FACS. Las exploraciones secundarias incluyeron ensayar la capacidad del sobrenadante del anticuerpo monoclonal de reconocer Cripto de superficie celular sobre un panel de líneas celulares tumorales (véanse las Tablas 1 y 2 para los resultados), la capacidad de los anticuerpos monoclonales de reconocer Cripto humana de forma inmunohistoquímica sobre secciones tisulares humanas de tumor de mama y colon, la capacidad de los anticuerpos monoclonales de bloquear la señalización en un ensayo de señalización Cripto-Nodal, la capacidad de bloquear el crecimiento de líneas celulares tumorales sobre plástico o en ensayos de agar blando, y la capacidad de internalizar Cripto de superficie celular.

C. ELISA

Los ensayos ELISA se realizaron del siguiente modo:

Materiales:

Placas: placas Costar de 96 pocillos de fácil lavado y elevada unión (07-200-642)

Anticuerpo secundario: Pierce Gt anti-Ms IgG (H+L)-HRP (P131430)

Sustrato: kit de sustrato Pierce TMB (34021)

Solución de detención: H_2SO_4 1 N

Tampones:

Tampón de unión: NaHPO_4 0,1 M pH 9,0

Tampón de bloqueo: PBS + Suero de Ternera Donante al 10%

Tampón de lavado: PBS + Tween® 20 al 0,1%

Se diluyeron antígenos CR(del C)-Fc y CR-EGF-Fc, la proteína de fusión de control de IgG1 hu en tampón de unión a 500 ng/ml. Se añadieron 100 μl por pocillo y se incubaron durante 1 h a 37°C o durante una noche a 4°C. El líquido se decantó y se invirtió la placa y se secó con papel secante hasta

sequedad. Después se añadieron 250 µl/pocillo de tampón de bloqueo, seguido de incubación durante 30 min. a 37°C. De nuevo, el líquido se decantó y la placa se invirtió y se secó con papel secante hasta sequedad. Los sobrenadantes se diluyeron 1:50 en tampón de lavado, y se sembraron a 50 µl/pocillo, seguido de incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3x vigorosamente con 250 µl/pocillo de tampón de lavado. Después se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario diluido en tampón de lavado a 1:10.000, seguido de incubación durante 30 min. a temperatura ambiente. Las placas después se lavaron 3x vigorosamente con 250 µl/pocillo de tampón de lavado, después se añadió sustrato a 100 µl/pocillo. Se permitió que se desarrollara color hasta que estuvo suficientemente oscuro, después se añadieron 100 µl/pocillo de solución de detención y se leyeron las placas para su absorbancia a 450 nm.

En ciertos experimentos, se recubrieron placas de 96 pocillos con proteínas Cripto añadiendo 100 µl de proteínas Cripto a 0,5 µg/ml en NaHPO₄ 0,1 M (pH 9,0) e incubando a 37°C durante 1 h. Se bloquearon las placas con PBS/DCS al 10%. Se añadieron anticuerpos diluidos en PBS/Tween® 20 al 0,05% a 50 µl/pocillo y se incubaron a 37°C durante 1 h. Se lavaron con PBS/Tween® 20 al 0,05% y se sondearon con anti-ratón-HRP (Pierce). Los anticuerpos unidos se detectaron añadiendo TMB, se detuvo la reacción con H₂SO₄ 1 N y se leyó a 450 nm.

En otros experimentos más, se recubrieron placas de 96 pocillos añadiendo a cada pocillo 100 µl de Activina B a 3-5 µg/ml u otro ligando en carbonato 50 mM (pH 9,5). Las placas se incubaron durante 1 h. a temperatura ambiente y se bloquearon durante una noche con TBS/BSA al 1% durante una noche a 4°C. La placa se incubó con CR-Fc o ALK4-Fc en tampón de bloqueo a temperatura ambiente, se lavó en TBST y se sondeó con anti-humano-AP (Jackson). La placa se lavó en TBST, una vez en tampón de sustrato 10x (Tris-HCl 200 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 9,8) y se añadió CSPD y Sapphire (Applied Biosystems).

D. Citometría de Flujo

Pueden usarse las líneas celulares Cripto positivas para ensayar los anticuerpos monoclonales para la unión a Cripto usando tinción de superficie celular y citometría de flujo del siguiente modo:

Se liberan células de matraces T162 con 2 ml de PBS con EDTA 5 mM,

10 min., a 37°C. Se llevan a 20 ml con medio con suero, pipeteando arriba y abajo varias veces para desaglomerar las células. Se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos. Se lavan las células con 5-10 ml de PBS a 4°C con BSA al 0,1% (tampón de lavado). Se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos. Se resuspenden a 4×10^6 - 10^7 /ml en tampón de lavado. Se mantienen en hielo.

Se preparan los anticuerpos para la tinción. Los anticuerpos purificados se diluyen a 1-10 µg/ml en tampón de lavado. Se añaden 50 µl de células a una placa de fondo en V de 96 pocillos Linbro (ICN 7632105). Se siembra un pocillo de células para cada control para cada línea celular a analizar, incluyendo células para la ausencia de anticuerpo, anticuerpo secundario solamente, medio de hibridoma, sobrenadando de anticuerpo de control positivo, si está disponible, o purificado, y un control de subclase de IgG (si se usan anticuerpos purificados).

Se siembra un pocillo de células para cada muestra experimental para cada línea celular a analizar. Se centrifuga la placa, 1200 rpm durante 5 minutos, usando una centrífuga de sobremesa a 4°C. Se aparta el tampón invirtiendo la placa y agitándola hasta que el líquido se elimine sustancialmente. Se añaden 40-50 µl de anticuerpos (o tampón de lavado para los pocillos de control de ausencia de anticuerpo y de solamente anticuerpo secundario) a los pocillos. Se incuban al menos 30 min.-1 hora a 4°C. Se centrifuga la placa, 1200 rpm durante 5 minutos. Se apartan las soluciones de anticuerpo. Se lavan los pocillos dos veces con 200 µl de tampón de lavado por pocillo, agitando después de cada lavado. Se aparta el tampón.

Se resuspenden las células en cada pocillo en 50 µl de dilución 1:200 (en tampón de lavado) de IgG de cabra anti-ratón marcado con R-PE, Fc específico (Jackson ImmunoResearch Laboratories N° Cat. 115-116-071). Se incuban 20 min., 4°C, en la oscuridad. Se añaden 150 µl de tampón de lavado a las células en cada pocillo. Se centrifuga la placa a 1200 rpm durante 5 minutos. Se lava una vez con 200 µl de tampón de lavado por pocillo. Se resuspenden las células en 150 µl de PFA al 1% en PBS. Se transfieren los contenidos de cada pocillo a tubos separados (tubo Falcon de fondo redondo de poliestireno de 5 ml-352052). Se envuelven los tubos en lámina de estaño.

Los contenidos de los tubos después se leen por citometría de flujo.

Los resultados de dos exploraciones de ciertos anticuerpos monoclonales analizados por este método produjeron los siguientes resultados,

- resumidos en las siguientes Tablas 1 y 2, en las que la primera columna proporciona los nombres designados para los subclones de hibridoma, las siguientes dos columnas muestran los resultados de las exploraciones ELISA, y las columnas restantes muestran los resultados del análisis de citometría de flujo sobre cuatro líneas celulares cripto-positivas. Los resultados se dan en unidades de índice fluorescente medio (MFI).

Tabla 1:

Caracterización de Anticuerpos Monoclonales Anti-Cripto

Subclón de hibridoma	Nº depósito ATCC	Sobren. ELISA Cripto delC	Sobren. ELISA Cripto dominio tipo EGF	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
Control-ELISA		0,06	0,07				
Control-Ig de ratón				14	9	37	18
A6C12.11		2,21	0,07	11	35	29	8
A6F8.6	PTA-3318	2,32	0,08	11	50	29	10
A7H1.19		2,14	0,09	14	34	27	12
A8F1.30		2,15	0,1	17	27	32	28
A8G3.5	PTA-3317	2,39	0,09	9	30	25	15
A8H3.1	PTA-3315	2,4	1,7	9	44	23	10
A8H3.2		2,54	0,07	13	13	16	14
A19A10.30		2,02	0,09	9	40	20	10
A10B2.18	PTA-3311	2,36	0,07	40	63	100	43
A27F6.1	PTA-3310	2,28	1,19	9	44	26	17
A40G12.8	PTA-3316	2,27	1,59	10	47	26	16

10

Tabla 2:

Caracterización de Anticuerpos Monoclonales Anti-Cripto

Subclón de hibridoma	Nº depósito ATCC	Sobren. ELISA Cripto	Sobren. ELISA Cripto	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
----------------------	------------------	----------------------	----------------------	------------	-----------	---------	---------

		delC	dominio tipo EGF				
Control- ELISA		0,05	0,05				
Control- Ig de ratón				10	6	4	6
A2D3.23		0,93	0,90	73	138	37	27
A7A10.29		1,37	0,07	75	83	33	83
A9G9.9		1,39	0,07	52	62	32	82
A15C12.10		1,42	0,06	46	55	25	93
A15E4.14		1,38	0,06	50	63	23	95
A17A2.16		1,40	0,06	76	97	41	81
A17C12.28		0,96	0,97	6	16	3	22
A17G12.1	PTA-3314	1,30	1,37	61	66	26	78
A17H6.1		1,38	0,05	35	30	5	28
A18B3.11	PTA-3312	1,36	1,38	50	42	33	65
A19E2.7		1,40	0,06	53	59	26	99
B3F6.17	PTA-3319	1,37	0,06	77	51	39	89
B6G7.10	PTA-3313	1,38	1,40	28	22	22	56
B11H8.4		1,41	0, 06	59	101	39	107
B12C12.5		1,10	1,04	27	14	23	59
B15A2.6		1,40	0,06	36	44	22	59
C4A2.16		1,40	0,06	24	36	22	65

También se emplearon numerosos protocolos de inmunización diferentes usando la proteína CR(del C)-Fc así como los péptidos específicos de región como se describe a continuación. En estos casos, también se generaron hibridomas como se ha descrito. Se usaron péptidos Cripto además de o en lugar de la proteína CR(del C)-Fc. Estos protocolos identificaron algunos de los anticuerpos de la invención. Como apreciarán los especialistas en la técnica, estos experimentos indican que pueden usarse múltiples y diversos protocolos para generar los anticuerpos de la invención.

En un protocolo de inmunización ejemplar, se inmunizaron ratones RBP hembra de ocho semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) por vía

intraperitoneal (IP) con una emulsión que contenía 50 µg de proteína recombinante CR(delC)-Fc soluble o un péptido Cripto específico de región conjugado con hemocianina de lapa californiana (KLH) y adyuvante completo de Freund (FCA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Específicamente, se diluyó proteína CR(del C)-Fc o péptido Cripto CR40 (aa36-42; SEC ID N° 3)-KLH en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2 a una concentración estimada de 2 mg/ml. A esta proteína, se añadió un volumen igual de FCA antes de la emulsificación e inmunización. Se administraron IP cincuenta µl que contenían 50 µg de CR(del C)-Fc o péptido Cripto CR40-KLH emulsionado en cada ratón para la inmunización principal. Todas las posteriores inmunizaciones se dosificaron de forma similar usando adyuvante incompleto de Freund (FIA) o adyuvante_{1,2} RIBI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), como se describe a continuación. Se administraron inmunizaciones de refuerzo cada dos a tres semanas. Se recogieron muestras séricas de los ratones inmunizados antes de la primera inmunización, 7 días después de las inmunizaciones de refuerzo, y de nuevo antes de las fusiones celulares de linfocitos. Se midieron los títulos séricos usando tanto un ELISA como ensayo de citometría de flujo descrito a continuación.

Los diversos protocolos de inmunización ejemplares con diferentes antígenos Cripto, así como los anticuerpos identificados por los mismos, son los siguientes:

ANTÍGENO 1 - (CR(del C) - Fc):

Protocolo A:	
1º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FCA
2º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
3º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
4º	25 µg CR(del C)-Fc (IV) en PBS

Tabla 3:

Caracterización de Anticuerpos Monoclonales Anti-Cripto

mAb purificados	ELISA Cripto delC	ELISA Cripto dominio CFC	LS174T MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	H727 MFI	HT3 MFI
1-1A4C.2	0,197	0,682	141	371	441	503	596

2-2C9.2	0,557	0,796	305	407	309	820	205
2-3H9.2	0,637	0,354	127	84	123	191	59
2-4E5.6	0,626	0,328	90	71	127	183	47
2-4D1-3	0,866	0,946	31	18	67	197	104
IgG de control	0,05	0,05	33	16	47	74	19

Protocolo B:	
1º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FCA
2º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
3º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
4º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
5º	25 µg CR(del C)-Fc (IV) en PBS

ANTÍGENO 2 - (CR(del C) - Fc + péptido CR40)

Protocolo C:	
1º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FCA
2º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
3º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
4º	50 µg A10B2-KLH (IP) + FIA
5º	50 µg A10B2-KLH (IP) + FIA

5

Tabla 4:

Caracterización de Anticuerpos Monoclonales Anti-Cripto

Subclón de hibridoma	ELISA Cripto delC	ELISA Cripto dominio CFC	LS174T MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	H727 MFI	HT3 MFI
3-4E8.3	0,6	0,3	ND	ND	ND	ND	ND
3-3G1.1	0,5139	0,9206	298	97	1099	677	1538
IgG de control	0,05	0,05	33	17	88	19	10

ND= no determinado

ANTÍGENO 3 - (CR(del C) - Fc + preparación de membrana de tumor LS174T):

Protocolo D:	
1º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FCA
2º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
3º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
4º	~50 µg LS174T Cripto (IP) + RIBI

Tabla 5:

Caracterización de Anticuerpos Monoclonales Anti-Cripto

Subclón de hibridoma	ELISA Cripto delC	ELISA Cripto dominio CFC	H727 MFI	HT3 MFI
4-2F6	1,915	0,1145	19	5
4-3A7	0,1286	0,1186	49	5
4-1E2	0,13	0,3	53	24
IgG de control	0,05	0,05	8	5

5

ANTÍGENO 4 - (x=cantidad de péptido conjugado a KLH; también se inyecta péptido conjugado a KLH en ratones que se han pre-inmunizado con CR(del C)-Fc como se describe, por ejemplo, en el Protocolo C):

- Las secuencias de péptidos CRx ejemplares que se usaron y sus posiciones en la proteína Cripto de longitud completa son las siguientes:
- 10 CR40 = FRDDSIWPQEPAIRPR (aa46 - 42, A10.B2; SEC ID N° 3)
 CR41 = CPPSFYGRNCEHDVRKE (aa97 - 113; SEC ID N° 4)
 CR43 = GSVPHDTWLPPKKC (aa116 - 128; SEC ID N° 5)
 CR44 = SLCKSWHGQLRCFPQ (aa129 - 143; SEC ID N° 6)
 15 CR49 = acetilado N-SFYGRNCEHDVRRENC GSVPHDTWLPPKK-COO⁻ (aa100 - aa127; SEC ID N° 7)
 CR50 = acetilado N-LNEGTCMLGSFCACPPSFYGRNCEHDVRK-COO⁻ (aa84 - aa112, incluye la región de fucosilación; SEC ID N° 8)
 CR51 = acetilado N-PHNTWLPPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCD-COO⁻
 20 (aa119 - aa150; SEC ID N° 9)

Protocolo E:

1º	50 µg CRx-KLH (IP) + FCA
2º	50 µg CRx-KLH (IP) + FIA
3º	50 µg CRx-KLH (IP) + FIA
4º	25 µg CR(del C)-Fc (IV) en PBS

Protocolo F:	
1º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FCA
2º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
3º	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
4º	25 µg CRx-KLH (IP) + FIA

Ejemplo 3: Ensayo Celular Nulo para la Inhibición de la Actividad de Cripto

A continuación se describe un ensayo de señalización de células F9 Cripto null usado para evaluar la inhibición de la actividad de Cripto.

Día 0 Se recubren placas de 6 pocillos con gelatina al 0,1% a 2 ml/pocillo a 37°C durante 15 min.

Se siembran las células a 6×10^5 células F9 CRIPTO NULL por pocillo.

Día 1 Transfección:

Se añade cada una de las siguientes muestras a 300 µl de OptiMeml para producir la solución A para cada muestra:

Muestra 1: 0,5 µg de ADNc informador (N₂)₇ luciferasa FAST más 1,5 µg de ADNc de vector vacío.

Muestra 2: 0,5 µg de (N₂)₇ luciferasa, 0,5 µg de FAST, y 1 µg de ADNc de vector vacío.

Muestra 3: 0,5 µg de (N₂)₇ luciferasa, 0,5 µg de Cripto ADD, 0,5 µg de FAST, y 0,5 µg de ADNc de vector vacío.

Muestra 4: 0,5 µg de (N₂)₇ luciferasa, 0,5 µg de Cripto, 0,5 µg de FAST, y 0,5 µg de ADNc de vector vacío.

Muestra 5: 0,5 µg de (N₂)₇ luciferasa, 0, 5 µg de Cripto, 0,5 µg de FAST, y 0,5 µg de ADNc de vector vacío.

Muestra 6: 0,5 µg de (N₂)₇ luciferasa, 0,05 µg de Cripto, 0,5 µg de FAST, y 0,5 µg de ADNc de vector vacío.

Muestra 7: 0,5 µg de (N₂)₇ luciferasa, 0,5 µg de Cripto, 0,5 µg de FAST, y 0,5 µg de ADNc de vector vacío.

Muestra 8: 0,5 µg de (N₂)₇ luciferasa, 0,5 µg de Cripto, 0,5 µg de FAST, y 0,5

µg de ADNc de vector vacío.

Muestra 9: 0,05 µg de (N₂)₇ luciferasa, 0,5 µg de Cripto, 0,5 µg de FAST, y 0,5 µg de ADNc de vector vacío.

La solución B comprende 30 µl de Lipofectamina más 270 µl de OptiMeml.

- 5 Para cada muestra, se mezclan la solución A y la solución B juntas. Se incuban 45 minutos a temperatura ambiente. Se aclaran los pocillos con 2 ml/pocillo de OptiMeml. Se aspira justo antes de la siguiente etapa.

- Se añaden 2,4 ml de OptiMeml a cada mezcla de soluciones A+B, se mezclan, se añaden 1,5 ml/pocillo a pocillos duplicados. Se incuban 5 horas a
- 10 37°C. Se añaden 1,5 ml/pocillo de DMEM+FCS al 20%, Gln 2 mM, P/S a pocillos que recibieron las muestras 1-3. Se añaden anticuerpos anti-Cripto del siguiente modo: pocillos de Muestra 4: A27F6.1, 10 µg/ ml; pocillos de Muestra 5: A27F6.1, 2 µg/ml; pocillos de Muestra 6: A40G12.8, 10 µg/ml; pocillos de Muestra 7: A40G12.8, 2 µg/ml; pocillos de Muestra 8: A10B2.18, 10 µg/ml;
- 15 pocillos de Muestra 9: A10B2.18, 2 µg/ml.

Día 2 Se retira el medio, se lavan las células con PBS, 2 ml/pocillo. Se añade DMEM+FCS al 0,5%, Gln 2 mM, P/S con las mismas cantidades de anticuerpos contra Cripto que el día anterior, a los mismos pocillos.

- 20 *Día 3* Se desarrolla la señal de luciferasa. Se lavan los pocillos con PBS+Ca²⁺ y Mg²⁺, 2 ml/pocillo. Se usa el kit LucLite, Packard nº cat. 6016911. Se llevan el tampón y el sustrato a temperatura ambiente. Luces tenues. Se reconstituye el sustrato con 10 ml de tampón. Se diluye 1:1 con PBS + Ca²⁺ y Mg²⁺. Se aspiran los pocillos. Se añaden rápidamente 250 µl de
- 25 sustrato diluido por pocillo usando un pipeteador de repetición. Formar un remolino en la solución y transferir 200 µl a los pocillos de una placa de fondo opaco blanca de 96 pocillos, Falcon 35-3296. Leer la placa en un luminómetro usando Winglow, exportando los datos a Excel.

- Los resultados de este ensayo con ciertos anticuerpos de la invención se
- 30 resumen a continuación en la Tabla 3.

Tabla 6:

Ensayo de Actividad de Cripto: Inhibición con Anticuerpos Monoclonales Anti-Cripto

ADNc transfectados	Anticuerpo anti-Cripto	Unidades luminescentes relativas
(N ₂) ₇ luc	Ninguno	123
(N ₂) ₇ luc, FAST	Ninguno	259
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	Ninguno	3091
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	A27F6.1 10 µg/ml	1507
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	A27F6.1 2 µg/ml	2297
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	A40G12.8 10 µg/ml	1213
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	A40G12.8 2 µg/ml	2626
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	A10B2.18 10 µg/ml	3466
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	A10B2.18 2 µg/ml	3103

5 También se ensayaron otras concentraciones de anticuerpo A27F6.1. Se observó que la adición de 0,5-20 mg/ml de mAb A27F6.1 al medio de estas células inhibía la señal de luciferasa inducida por Cripto en un 34-95% (Figura 1). También se ensayaron otros anticuerpos de la invención y se observó que los mAb A6C12.11 y A8G3.5 también inhibían la producción de señal.

10 Como sistema de ensayo alternativo, se ensayaron los mAb específicos de Cripto de la invención para la inhibición de la actividad FAST/(N₂)₇-luc en células NCCIT. Estos ensayos eran similares a aquellos para células las F9, excepto en que se requiere la expresión ectópica de Nodal y ALK4 en estas células para la activación del informador. Se observó que el mAb A27F6.1
15 disminuía la actividad luciferasa en estas células en un 90% tanto a 2 como a 20 µg/ml (Figura 2).

Ejemplo 4: Ensayo para la Inhibición *In Vitro* del Crecimiento Celular Tumoral

La inhibición de la actividad de Cripto también puede ensayarse midiendo el crecimiento de células GEO en agar blando. Véase, por ejemplo,
20 Ciardiello et al., 1994, Oncogene 9:291-98; Ciardiello et al., 1991, Cancer Res. 51:1051-54.

Se fundió bactoagar al 3% y se mantuvo a 42°C en un baño de agua. Se mezcló la solución de bactoagar al 3% con medio completo pre-calentado para

crear una solución de bactoagar al 0,6% y se mantuvo a 42°C. Se sembraron 4 ml de la solución en una placa de 6 cm y dejó enfriar durante al menos 30 minutos para permitir que se formar la capa de agar inferior. Se trató con tripsina las células GEO y se resuspendieron a 10^5 células/ml en medio completo. Se añadieron los anticuerpos a ensayar, o controles, a las suspensiones celulares, titulando los anticuerpos de 20 µg a 1 µg. Se mezclaron volúmenes iguales de las suspensiones de células GEO y bactoagar al 0,6% y se depositaron 2 ml sobre la parte superior de la capa de agar inferior. Se dejó que las placas se enfriaran durante al menos 1 hora. Se incubaron durante 14 días a 37°C en un incubador de CO₂. Se contaron las colonias visibles sin el uso de un microscopio. La ausencia de colonias, en comparación con los controles negativos, indicó que el anticuerpo ensayado inhibía el crecimiento de células tumorales *in vitro*.

Este ensayo se usó para producir los resultados mostrados en la Tabla 4 para los anticuerpos A27F6.1 y B6G7.10, ambos cuales muestran la capacidad de disminuir el crecimiento de colonias de células GEO.

Tabla 7:

Resultados de crecimiento en ensayo de agar blando

Anticuerpo		Cantidad promedio de colonias
ninguno		109,0
ninguno		104,3
A27.F6	20 µg/ml	82,0
A27F6.1	10 µg/ml	78,3
A27F6.1	5 µg/ml	79,0
A27F6.1	1 µg/ml	108,7
B6G7.10	20 µg/ml	102,3
B6G7.10	10 µg/ml	71,7

También se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento con células T-47D (ATCC) que es un carcinoma de mama humano no tumorigénico descrito en el Ejemplo 9.

Ejemplo 5: Ensayo para la Inhibición *In Vivo* del Crecimiento Celular Tumoral

Para evaluar la inhibición del crecimiento celular tumoral, se implanta una línea celular tumoral humana de forma subcutánea en ratones desnudos

atímicos y se observan los efectos de los anticuerpos de la invención, con y sin tratamientos quimioterapéuticos adicionales que pueden proporcionar efectos sinérgicos o aditivos sobre la inhibición tumoral.

- Este ensayo puede realizarse como alternativa usando diferentes líneas celulares tumorales, tales como, por ejemplo, GEO (una línea celular *in vitro* de cáncer de colon humano bien diferenciada, que se obtiene de la American Tissue Type Collection (ATCC)), DU-4475 (una línea celular *in vitro* de cáncer de mama obtenida de la ATCC), NCCIT (un línea celular de tumor testicular obtenida de la ATCC), u otras conocidas en la técnica. Un ejemplo de dichos ensayos se describe a continuación.

Los animales se marcaron individualmente por perforaciones en las orejas. La línea celular GEO se pasa *in vitro* o *in vivo* durante 1-4 pases. Se implanta a los animales las células GEO de forma subcutánea en el área del costado derecho. Pueden usarse los siguientes grupos de animales:

<u>Nº grupo</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Nº de ratones</u>
1.	Control salino, 0,2 ml/ratón, i.p. tres veces a la semana (L,M,V)	20
2.	MAB, dosis baja, i.p.	10
3.	MAB, dosis media, i.p.	10
4.	MAB, dosis alta, i.p.	10
5.	5-FU, 30 mg/kg/iny., i.p., 3 Rx/sem. (L,M,V)	10
6.	Cisplatino, 2 mg/kg/iny., s.c., 3 Rx/sem. (L,M,V)	10
7.	Adriamicina, 1,6 mg/kg/iny., i.p., 3 Rx/sem. (L,M,V)	10
8.	Irinotecano, 10 mg/kg/iny., i.p., 5 Rx/sem. (L-V)	10
9.	MAB, dosis baja, i.p. + 5-FU (dosis intermedia)	10
10.	MAB, dosis media, i.p. + 5-FU (dosis intermedia)	10
11.	MAB, dosis alta, i.p. + 5-FU (dosis intermedia)	10
12.	MAB, dosis baja, i.p. + Cisplatino	10
13.	MAB, dosis media, i.p. + Cisplatino (dosis intermedia)	10
14.	MAB, dosis alta, i.p. + Cisplatino (dosis intermedia)	10
15.	MAB, dosis baja, i.p. + Adriamicina (dosis intermedia)	10
16.	MAB, dosis media, i.p. + Adriamicina (dosis intermedia)	10

17.	MAB, dosis alta, i.p. + Adriamicina (dosis intermedia)	10
18.	MAB, dosis baja, i.p. + Irinotecano (dosis intermedia)	10
19.	MAB, dosis media, i.p. + Irinotecano (dosis intermedia)	10
20.	MAB, dosis alta, i.p. + Irinotecano (dosis intermedia)	10

Día 0: Se implanta el tumor, se registra el peso corporal inicial de los animales.

5 Día 1: Se inicial los tratamientos como se ha indicado anteriormente.

Día 5: Se comienzan las mediciones del tamaño del tumor y el peso corporal y se continúa dos veces a la semana hasta terminar el experimento.

10 Se examinan las mediciones de peso corporal inicial, tamaño del tumor y peso corporal, la histología al sacrificio, y el análisis inmunohistoquímico de los tumores para la expresión de Cripto, el crecimiento tumoral, y la inhibición del mismo.

Ejemplo 6: Modelo Tumoral de Xenoinjerto *In Vivo* - anticuerpo anti-Cripto de bloqueo de Cys-rico

15 Para evaluar la respuesta de NCCIT, una línea celular de carcinoma testicular humano, se implantó de forma subcutánea un anticuerpo que se une a un dominio cys-rico de Cripto. Los métodos experimentales se enumeran a continuación. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Métodos y Materiales

20 Animales: Se usaron ratones macho desnudos atímicos. Los animales se numeraron individualmente por perforaciones en las orejas.

Tumor: NCCIT, línea celular in vitro de carcinoma testicular humano de células germinales mixtas mediastinales originalmente obtenido de la American Tissue Type Collection. La línea celular se pasó *in vitro* durante seis pases en
25 RPMI-1640/FBS al 10% sin antibióticos. Se implantó de forma subcutánea a los animales 5×10^5 células/0,2 ml de matrigel en el costado derecho de los animales.

<u>Nº grupo</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Nº de ratones</u>
1.	Control de vehículo (fosfato sódico 25 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 7,2), 0,2 ml/ratón, i.p., Q14D Los tratamientos empiezan en el día -1	20
2.	A8G3.5, 1 mg/kg/iny., i.p., Q14D Los tratamientos empiezan en el día -1	10
3.	A8G3.5, 3 mg/kg/iny., i.p., Q14D Los tratamientos empiezan en el día -1	10
4.	A8G3.5, 10 mg/kg/iny., i.p., Q14D Los tratamientos empiezan en el día -1	10
5.	Cis-platino, 2 mg/kg/iny., s.c., 3x/sem. (L, M, V) durante 6 tratamientos	10

Los tratamientos empezaron en el día 1.

Programa de ensayo

Día -1: Los ratones se adjudicaron aleatoriamente a los grupos de control y tratamiento. Se registró el peso corporal inicial de los animales. Se administraron los primeros tratamientos a los grupos de anticuerpo. Se hicieron las soluciones de dosificación. Los tratamientos se hicieron ciegos a los técnicos hasta que se terminó el ensayo.

Día 0: Se implantó el tumor. Se procesaron cultivos bacterianos sobre el tumor implantado en los ratones.

Día 1: Se administró el primer tratamiento al grupo quimioterapéutico positivo.

Día 4: Se registraron las mediciones de tamaño tumoral inicial para el tumor inicialmente en matrigel. Se continuó registrando el tamaño del tumor y los pesos corporales en los ratones 2x/semana. Se controló el estudio diariamente y se hicieron anotaciones de cualquier observación inusual sobre los animales.

Criterios de valoración: Peso corporal inicial

Mediciones de tamaño tumoral y peso corporal

Ejemplo 7: Modelo Tumoral de Xenoinjerto *In Vivo* - anticuerpo anti-Cripto de bloqueo de dominio tipo EGF

Para evaluar la respuesta de NCCIT, una línea celular de carcinoma testicular humano, se implantó de forma subcutánea un anticuerpo que se une

a un dominio cys-rico de Cripto. Los métodos experimentales se enumeran a continuación. Los resultados se muestran en la [Figura 4](#).

Métodos y Materiales

Animales: Se usaron ratones macho desnudos atímicos. Los animales se numeraron individualmente por perforaciones en las orejas.

Tumor: NCCIT, línea celular *in vitro* de carcinoma testicular humano de células germinales mixtas mediastinales originalmente obtenido de la American Tissue Type Collection. La línea celular se pasó *in vitro* durante seis pases en RPMI-1640/FBS al 10% sin antibióticos. Se implantó de forma subcutánea a los animales 5×10^5 células/0,2 ml de matrigel en el costado derecho de los animales.

<u>Nº grupo</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Nº de ratones</u>
1.	Control de vehículo (fosfato sódico 25 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 7,2), 0,2 ml/ratón, i.p., Q14D Los tratamientos empiezan en el día -1	18
2.	A27F6.1, 1 mg/kg/iny., i.p., Q14D Los tratamientos empiezan en el día -1 con una dosis de carga de 2,6 mg/kg/ratón	10
3.	A27F6.1, 10 mg/kg/iny., i.p., Q14D Los tratamientos empiezan en el día -1 con una dosis de carga de 21,2 mg/kg/ratón	10
4.	Cis-platino, 2 mg/kg/iny., s.c., 3x/sem. (L, M, V) durante 6 tratamientos	10

Los tratamientos empezaron en el día 1.

Programa de ensayo

Día -1: Los ratones se adjudicaron aleatoriamente a los grupos de control y tratamiento. Se registró el peso corporal inicial de los animales. Se administraron los primeros tratamientos a los grupos de anticuerpo. Se hicieron las soluciones de dosificación. Los tratamientos se hicieron ciegos a los técnicos hasta que se terminó el ensayo.

Día 0: Se implantó el tumor. Se procesaron cultivos bacterianos sobre el tumor implantado en los ratones. El cultivo bacteriano fue negativo para contaminación a las 24 y 48 horas después del muestreo.

Día 1: Se administró el primer tratamiento al grupo quimioterapéutico

positivo.

Día 4: Se registraron las mediciones de tamaño tumoral inicial para el tumor inicialmente en matrigel. Se continuó registrando el tamaño del tumor y los pesos corporales en los ratones 2x/semana. Se controló el estudio
5 diariamente y se hicieron anotaciones de cualquier observación inusual sobre los animales.

Criterios de valoración: Peso corporal inicial

Mediciones de tamaño tumoral y peso corporal

Ejemplo 8: Los mAb contra Cripto Modulan la Unión de ALK4

10 Para evaluar si los anticuerpos monoclonales específicos para Cripto pueden interferir con la capacidad de Cripto de unirse a ALK4, el receptor tipo I de activina, se usó análisis de citometría de flujo usando una línea celular 293 que expresa de forma estable ALK4. Para generar esta línea celular, se
15 contranfectaron células 293 con un plásmido que expresa ALK4 marcado en el extremo C con un epítipo HA y un plásmido que expresa puromicina a una proporción 10:1. Las células transfectadas después se seleccionaron en puromicina hasta que se formaron colonias. Después se cogieron las colonias, se expandieron y se analizaron para la expresión de ALK4 usando análisis de transferencia de western para HA. Se descubrió que el clon 21 (293-Alk4-21)
20 expresaba elevados niveles de ALK4 en comparación con el control, células 293 sin transfectar.

Para analizar la unión Cripto-ALK4 por citometría de flujo, se empleó una forma soluble y purificada de Cripto humana (aa1-169) fusionada a la parte Fc de IgG humana (CR(del C)-Fc). Se incubaron aproximadamente 5 µg/ml de
25 CR(del C)-Fc o proteína Fc de control con 3×10^5 células 293-A1K4-21 en hielo durante 30 minutos en 50 µl de volumen total de tampón FACS (PBS con BSA al 0,1%). Para la muestras que contenían anticuerpos anti-Cripto, se preincubaron 5 µg/ml de CrdelC-Fc con 50 µg/ml de cada anticuerpo contra Cripto (A10.B2.18, A40.G12.8, A27.F6.1, A8.H3.1, A19.A10.30, A6.F8.6,
30 A8.G3.5, A6.C12.11) en hielo antes de la adición de las células. Las células después se lavaron en tampón FACS y se detectó la proteína Fc unida incubando las células con un anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con R-ficoeritrina (específico del fragmento Fc) de Jackson Immunologics. Después se lavaron de nuevo las muestras, se fijaron en paraformaldehído al
35 1% en PBS, y se analizaron usando procedimientos de citometría de flujo

convencionales. Los resultados del ensayo FACS se muestran en la [Figura 5](#).
Ejemplo 9: Cripto Altera la Supresión del Crecimiento Inducida por Activina B de Células de Cáncer de Mama

Se transfectaron células T47D, mantenidas en RPMI/FCS al 10%/10
 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, en pase nº 2 de la ATCC con un plásmido de expresión para el Receptor Ecotrópico (EcoR; B. Elenbaas) y se seleccionaron en medio que contenía 100 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina. Las colonias de T-47D-EcoR que permitían la infección del virus de la leucemia murina pBABE-GFP (MLV) se cultivaron aparte, se infectaron con pBABE-hCr-PURO-MLV y se seleccionaron en medio
 10 de puromicina. Esta línea oligoclonal (T-47D-hCr) se analizó por FACS para la expresión de hCr (Cripto humana) con anticuerpos anti-Cripto específicos. Se sembraron aproximadamente 4000 células/pocillo de T-47D-EcoR o T-47D-hCr en una placa de 96 pocillos en medio que contenía suero al 2% con/sin 25 ng/ml de Activina B (R&D) o 25 ng/ml de Activina B más 0,1-50 $\mu\text{g/ml}$ de
 15 A8G3.5. El medio con factores se reemplazó diariamente durante 7-8 días. La placa se recogió añadiendo 20 μl /pocillo de solución CellTiter AQueous One (Promega), incubando 2 horas a 37°C, y leyendo a 490 nm.

Se cultivaron células T-47D y T-47D-EcoR en condiciones de bajo contenido en suero, con o sin Activina A o B y se ensayaron para células
 20 proliferantes usando un ensayo colorimétrico MTT. Se observó que la proliferación de células T-47D se inhibía por Activina A o B en aproximadamente el 40% en comparación con células no tratadas ([Figura 6](#)). También se observó que las células T-47D-CR se inhibían por Activina A, pero se descubrió que las células T-47D-CR no eran sensibles a Activina B ([Figura](#)
 25 [6](#)). Este resultado indica que el efecto de Cripto sobre la proliferación de estas células es específico para Activina B. Se observó en experimentos de control que células T-47D y T-47D-CR no tratadas no diferían en las velocidades de proliferación en medio normal o en condiciones de bajo contenido en suero.

Después se ensayó si los anticuerpos de la invención pueden inhibir la
 30 interacción Cripto-Activina B. Se trataron células T-47D-CR con Activina B en presencia de diversos anticuerpos de la invención. Se observó que la actividad de supresión del crecimiento de Activina B se recuperaba en presencia de 10 o 20 $\mu\text{g/ml}$ de mAb A8G3.5 ([Figura 7](#)). Se observó que los mAb A27F6.1 eran incapaces de recuperar la supresión del crecimiento por Activina B de estas
 35 células.

Ejemplo 10: Cripto se Une Directamente a Activina B

Se descubrió que Cripto se une directamente a Activina B. Se recubrieron placas ELISA con Activina B, Activina A, TGF β 1, GDNF o BMP2 purificados y se incubaron con CR-Fc. Después se añadió anticuerpo anti-Fc conjugado con fosfatasa alcalina y se controló la unión añadiendo un sustrato de fosfatasa alcalina y revelando. Se observó que CR-Fc se unía a pocillos que contenían Activina B, pero no a Activina A o los otros ligandos (Figura 8). Además, se pre-incubó CR-Fc con Activina A o B en solución antes de añadirlo a una placa recubierta con Activina B y se observó que solamente la Activina B inhibía la unión (Figura 9). Estos resultados confirmaron que Cripto se une específicamente a Activina B.

También se analizó la interacción Cripto-Activina B usando Biacore. Se descubrió que la Activina B se une directamente a CR-Fc inmovilizada en un chip Biacore con una alta intensidad, pero no a una proteína de control LT β R-Fc (Figura 10). También se observó que la unión de Activina A a CR-Fc era insignificante. Estos datos indican que la Activina B se une a Cripto con rapidez respecto a la velocidad y una afinidad aparente en solución medida en un ensayo de formato competitivo de aproximadamente 1 nM.

Los anticuerpos monoclonales anti-CFC de Cripto 2-2C9.2 y A8G3 modulaban la interacción de Cripto con Activina B. Esto se demuestra por los experimentos de co-inmunoprecipitación en los que se inhibía la unión de Cripto a Activina B por la adición de A8G3 o 2-2C9.2. La inhibición se midió usando técnicas de transferencia de western convencionales con anticuerpos anti-Activina B.

Algunas de las realizaciones de la invención descrita anteriormente se resumen a continuación e incluyen, aunque sin limitación, las siguientes realizaciones. Como apreciarán los especialistas en la técnica, pueden hacerse numerosos cambios y modificaciones a las diversas realizaciones de la invención sin alejarse del espíritu de la invención. Se entiende que todas estas variaciones están dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo en el dominio de unión ligando-receptor que abarca los restos 75 a 150 de una secuencia de aminoácidos de Cripto mostrada en la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2 para su uso en el tratamiento de un tumor de cerebro, cabeza, cuello o próstata.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que se une específicamente a un epítipo de Cripto compuesto por el dominio rico en cisteína que abarca los restos aminoacídicos del aminoácido 114 al aminoácido 150 de la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2.
3. El anticuerpo de la reivindicación 2, que se une específicamente al epítipo de Cripto al que se une el anticuerpo producido por el hibridoma A8G3.5 (N° DE ACCESO A LA ATCC PTA-3317).
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que está conjugado a un agente quimioterapéutico.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que se administra en combinación con un agente quimioterapéutico no conjugado.
6. El anticuerpo de las reivindicaciones 4 ó 5, en el que el agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo compuesto por un profármaco activado por tumor, un radionúclido y una toxina.
7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que el agente quimioterapéutico es un profármaco activado por tumor.
8. El anticuerpo de la reivindicación 7, en el que el profármaco activado por tumor es un maytansinoide.
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que es humano.
10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que es monoclonal.
11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que está humanizado.

1/10

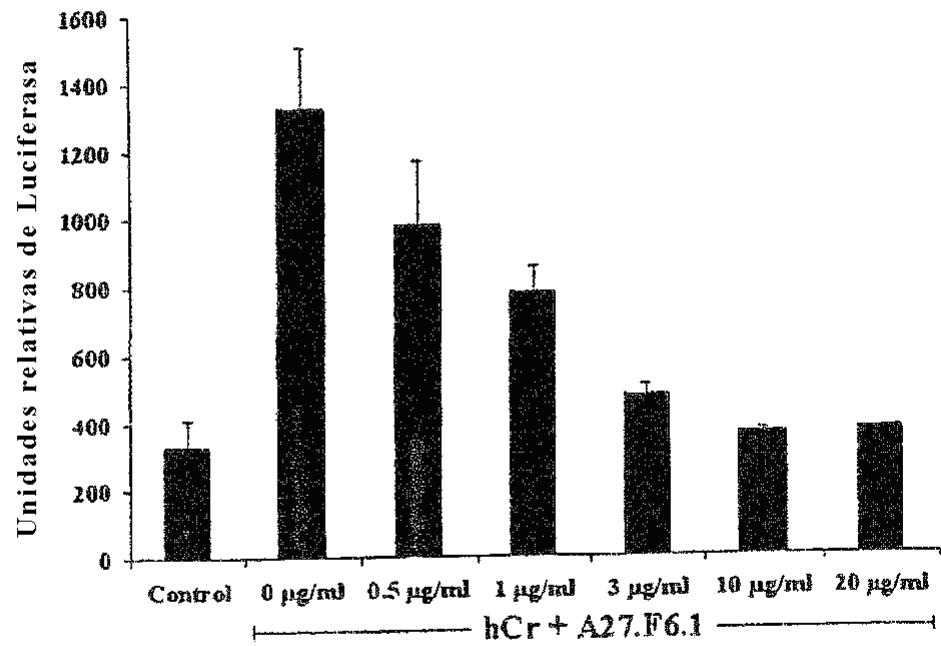


FIGURA 1

2/10

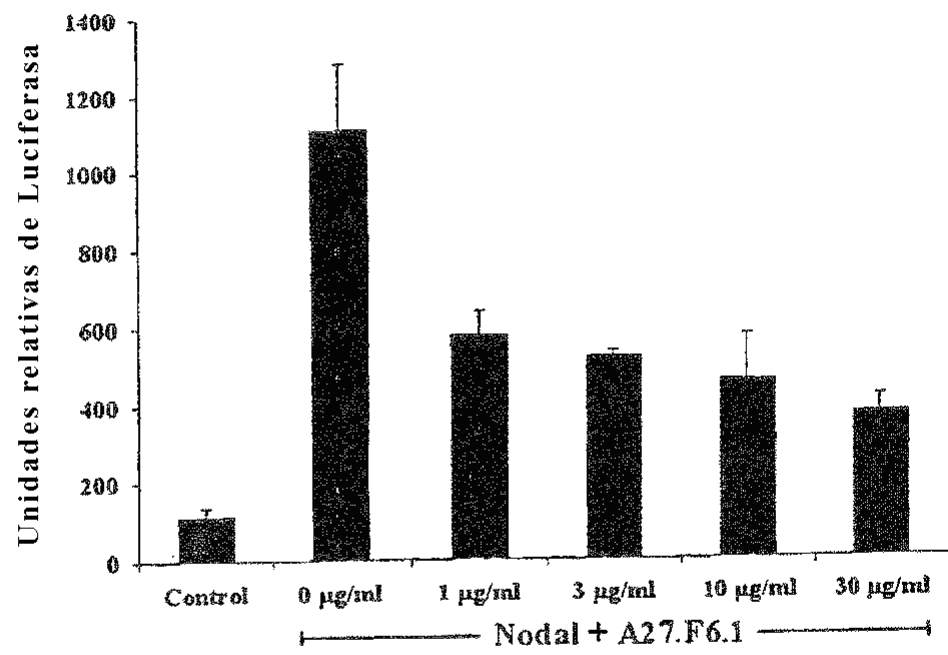


FIGURA 2

Respuesta de la línea celular de carcinoma testicular humano, NCCIT, al mAb anti-CFC de bloqueo de Cripto, A8G3.5

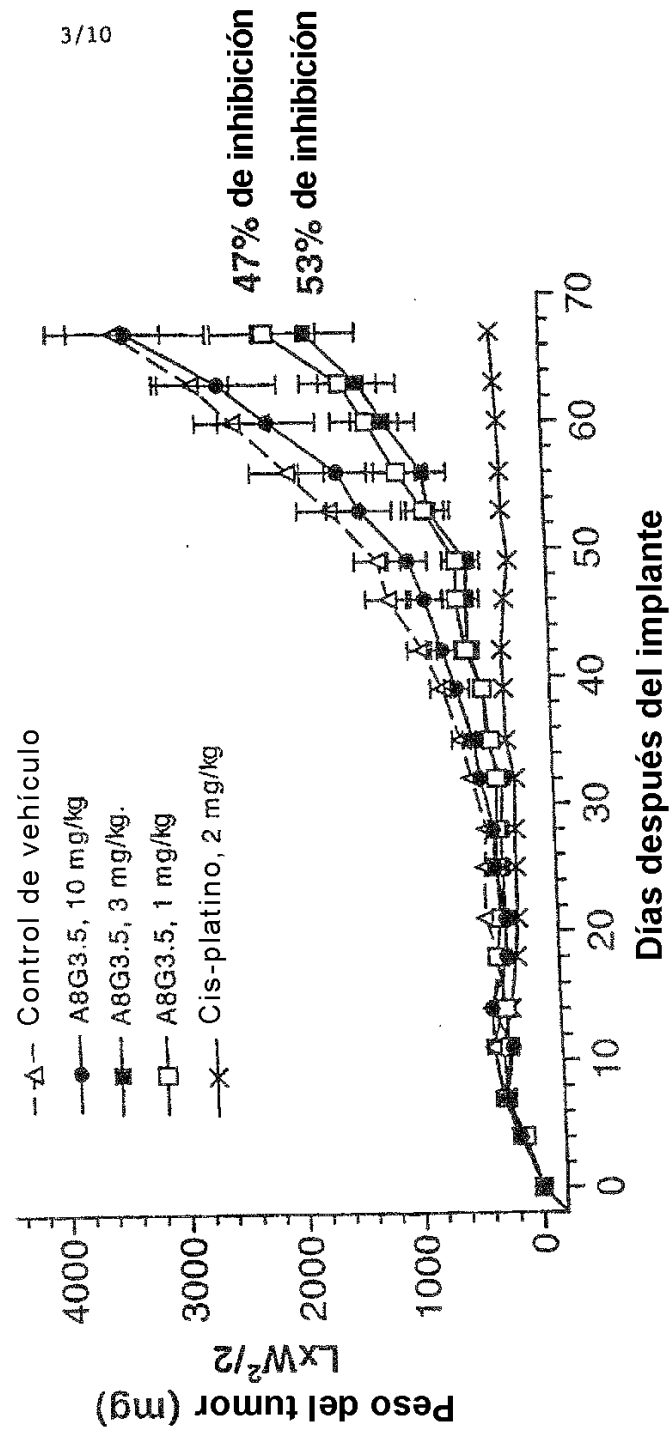


FIGURA 3

Respuesta de la línea celular de carcinoma testicular humano, NCCIT, al mAb anti-EGF de bloqueo de Cripto, A27F6.1

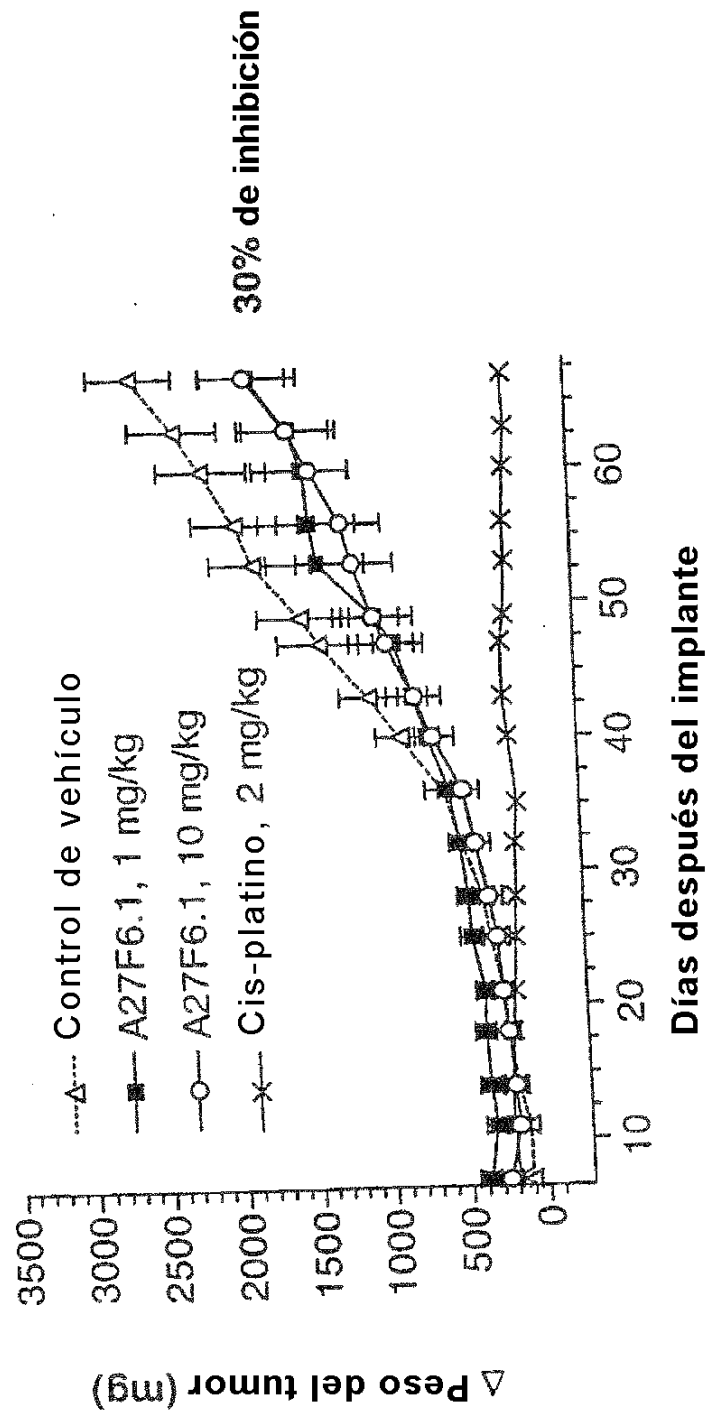


FIGURA 4

FACS: unión de células 293/ALK4 a CR-Fc

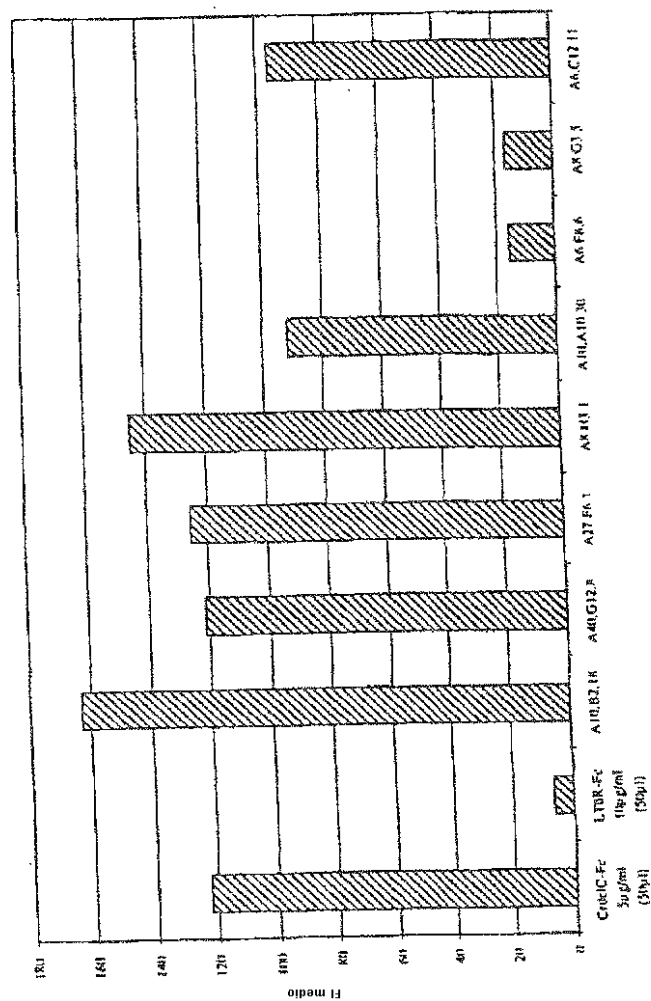


FIGURA 5

6/10

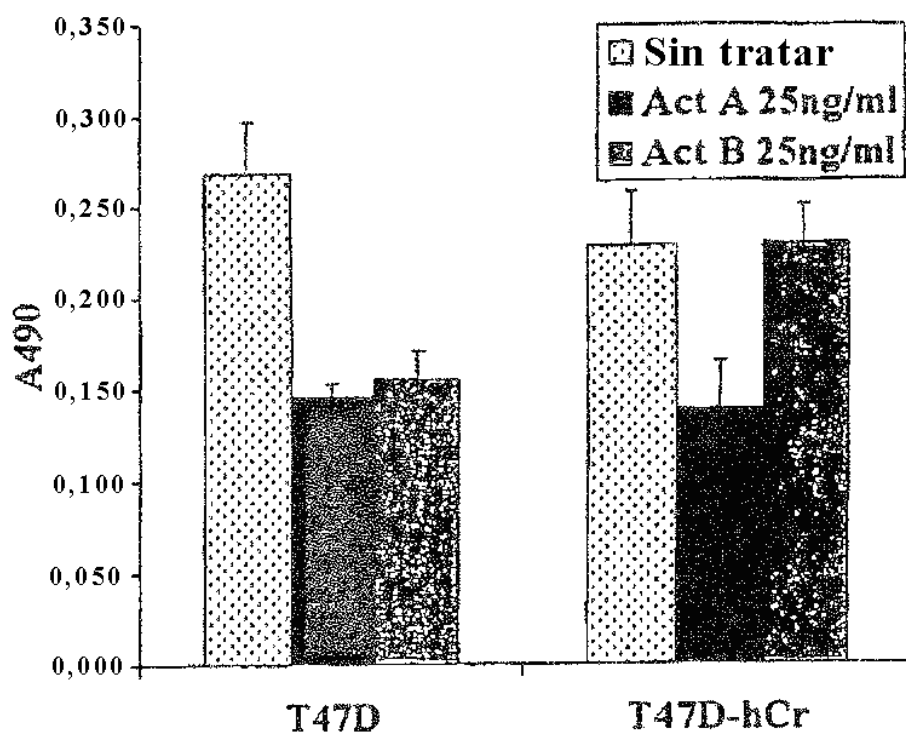


FIGURA 6

7/10

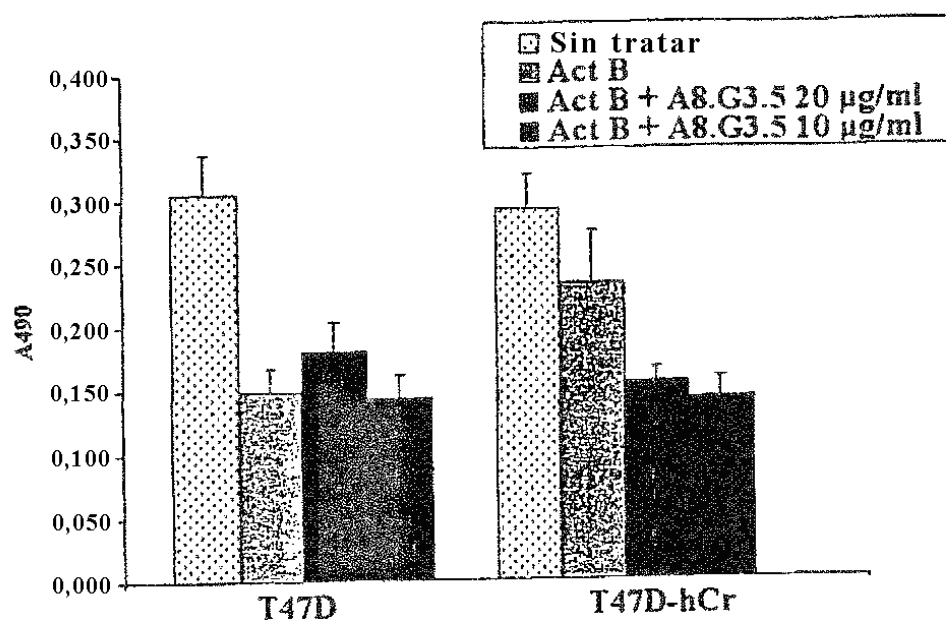


FIGURA 7

8/10

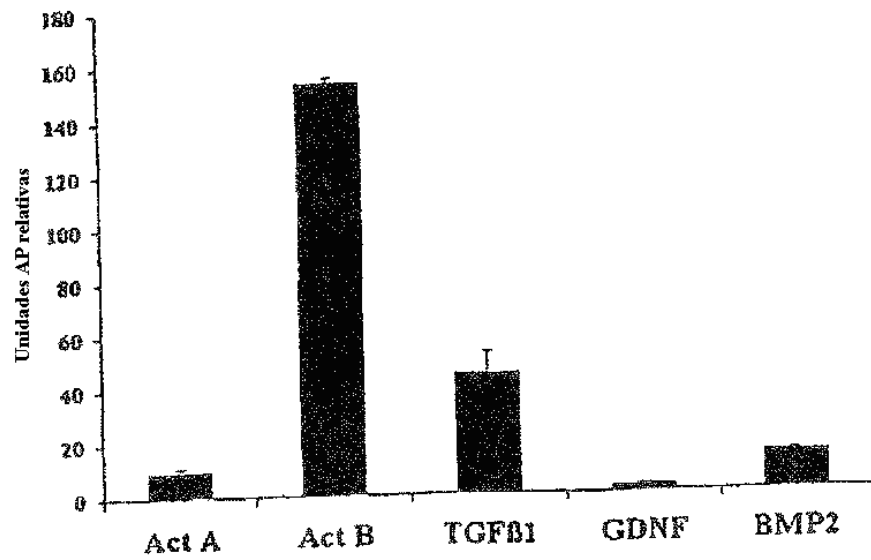


FIGURA 8

9/10

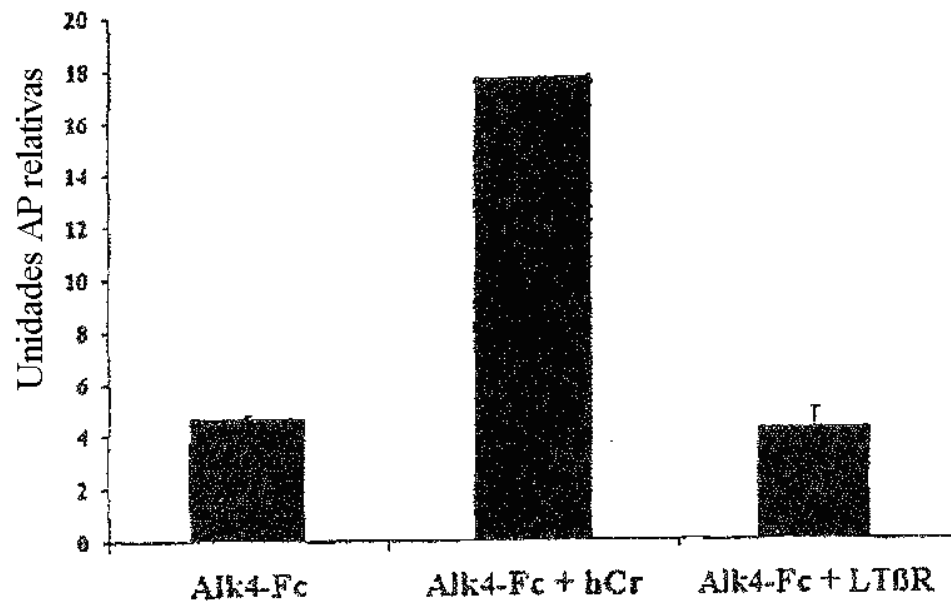


FIGURA 9

10/10

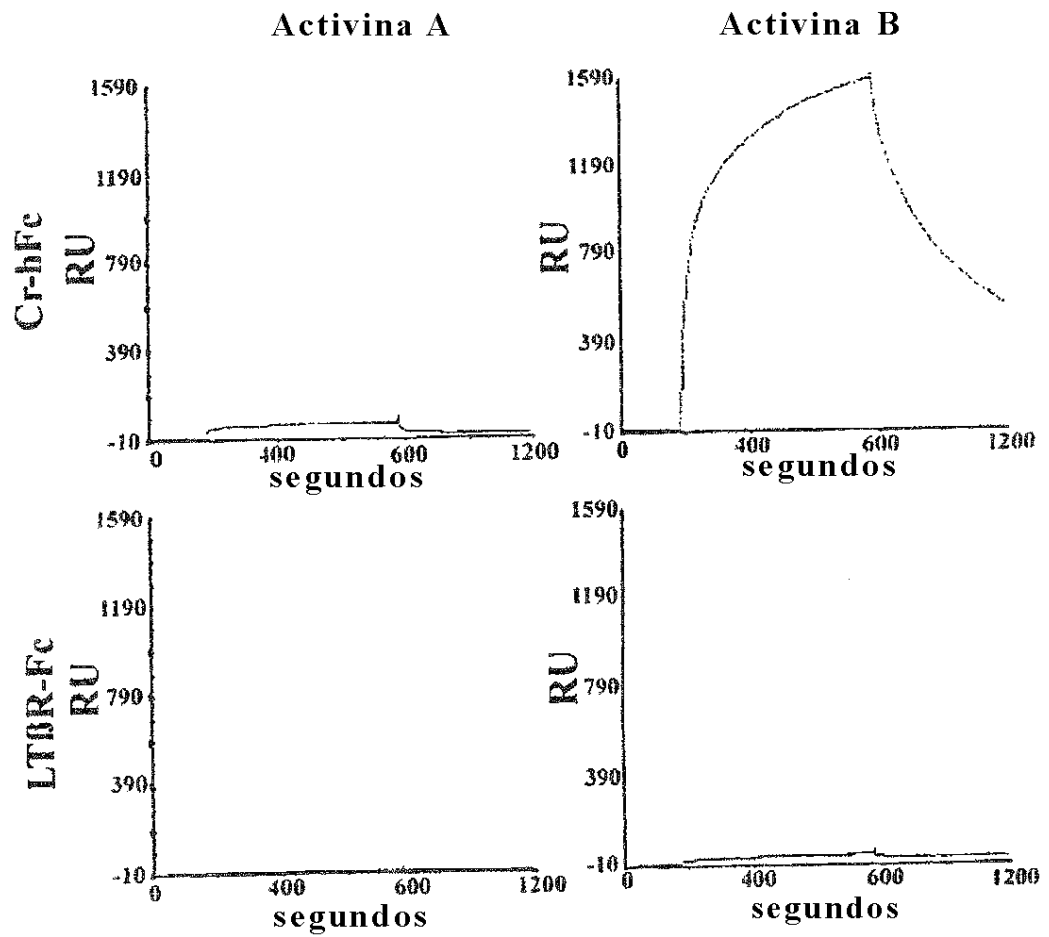


FIGURA 10