



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 917**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **A61P 35/04** (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) **A61P 1/16** (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01) **A61K 38/10** (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06706064 .0**

96 Fecha de presentación : **16.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1856153**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

54

Título: **Anticuerpo monoclonal YKL-40.**

30

Prioridad: **28.02.2005 DK 2005 00300**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2011

73

Titular/es: **BIO-Y A/S**
Strandgade 95
3000 Helsingoer, DK

72

Inventor/es: **Bonnichsen, Richard y**
Price, Paul, A.

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 358 917 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

Anticuerpo monoclonal YKL-40

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-YKL-40 humana monoclonales, que pueden inhibir el crecimiento y/o inducir apoptosis de células, en particular células cancerosas, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos y a usos de dichos anticuerpos y/o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de una enfermedad en la que la inhibición del crecimiento celular, la diferenciación celular, la remodelación de la matriz extracelular, la metástasis y/o la inducción de muerte celular debida a apoptosis es un requisito previo para un curado satisfactorio.

10 Antecedentes de la invención

YKL-40 se identificó por primera vez como una proteína secretada en grandes cantidades por una línea celular de osteosarcoma humana, MG63, *in vitro* y se denominó según los últimos tres aminoácidos N-terminales de su secuencia de aminoácidos, Tyr (Y), Lys (K) y Leu (L), y un peso molecular aproximado de 40 kDa (Johansen *et al.*, 1992).

15 El análisis de la secuencia de aminoácidos de YKL-40 reveló que la proteína pertenece a la familia de la glicosil hidrolasa 18 (Hakala *et al.*, 1993). La familia consiste en enzimas incluyendo quitinasas y también proteínas, que no tienen actividad enzimática. El gen de YKL-40 (CHI3L1) está ubicado en el cromosoma 1q31-1q32 y consiste en 10 exones y abarca aproximadamente 8 kilobases de ADN genómico (Rehli *et al.*, 1997). Los factores de transcripción de la familia Sp1 parecen tener un papel predominante en el control de la actividad del promotor de YKL-40 (Rehli *et al.*, 2003). Se ha descrito la estructura cristalográfica de YKL-40 humana (Fusetti *et al.*, 2003; Houston *et al.*, 2003). La proteína contiene dos dominios globulares: un dominio central grande que consiste en una estructura de dominio $(\beta/\alpha)_8$ con un pliegue de barril de triosa-fosfato isomerasa (TIM), y un dominio α/β pequeño, compuesto por cinco cadenas beta antiparalelas y una hélice α , insertada en el bucle entre la cadena $\beta 7$ y la hélice $\alpha 7$. Esto confiere al sitio activo de YKL-40 un carácter similar a una hendidura. La estructura de YKL-40 es en parte similar a la estructura de varias proteínas, por ejemplo quitotriosidasa humana (Fusetti *et al.*, 2002), Ym1 de ratón (Sun *et al.*, 2001), factor de crecimiento 2 de discos imaginales de *Drosophila melanogaster* (Varela *et al.*, 2002) y algunos otros miembros de la familia de la glicosil hidrolasa 18 (Coulson, 1994), aunque hay también diferencias importantes. Una de estas diferencias es una mutación de uno de los tres aminoácidos (Asp, Glu y Asp) esenciales para la actividad catalítica de tipo quitinasa, concretamente Glu \rightarrow Leu, que descarta completamente la función de YKL-40 como enzima glicolítica. YKL-40 puede unirse a quitina, pero no tiene actividad enzimática (Renkema *et al.*, 1998). YKL-40 es una glicoproteína y esto también es una característica única de YKL-40 en comparación con las otras proteínas similares a quitinasa de mamífero.

YKL-40 puede unirse a heparina. La secuencia de aminoácidos de la proteína contiene un motivo de unión a heparina ($^{143}\text{GRRDKQH}^{149}$) que está ubicado en un bucle superficial (Fusetti *et al.*, 2003). YKL-40 también puede unirse a hialuronano. La proteína plegada contiene dos posibles sitios de unión a hialuronano en la cara externa. YKL-40 humana puede unirse a quitina de diferentes longitudes de una manera similar que quitinasas de la familia 18. Se identificaron nueve subsitios de unión a azúcar en la hendidura de 43 Å de YKL-40 (Fusetti *et al.*, 2003). También es posible la unión de oligosacáridos cortos o largos a YKL-40 humana. La presencia de dos sitios de unión diferenciados con afinidad selectiva por oligosacáridos largos y cortos (no encontrados en otras proteínas similares a quitinasa de mamífero) puede tener significación para la actividad funcional de YKL-40 como reticulante entre dos dianas que portan estos oligosacáridos.

YKL-40 posee varias actividades biológicas. Así, se ha mostrado que YKL-40 humana puede actuar como factor de crecimiento para células de tejido conjuntivo, tales como condrocitos y células sinoviales (De Ceuninck *et al.*, 2001; Recklies *et al.*, 2002). YKL-40 también promueve el crecimiento de fibroblastos de una manera similar al factor de crecimiento 1 similar insulina (IGF-1) (Recklies *et al.*, 2002). En fibroblastos, YKL-40 inicia la activación de cascadas de señalización de MAP cinasa y PI3K que conducen a la fosforilación tanto de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK)-MAP cinasa 1/2 como la proteína cinasa B (AKT). Se ha sugerido que la activación de rutas de transducción de señales citoplasmáticas por YKL-40 está mediada a través de la interacción de YKL-40 con una o más moléculas receptoras en la membrana plasmática, aunque la identidad del receptor celular que media los efectos biológicos de YKL-40 se desconoce actualmente.

También se ha demostrado que YKL-40 actúa como quimioatrayente para células endoteliales y estimula la migración de estas células de manera comparable a la estimulación por el factor de crecimiento de fibroblastos básico (Malinda *et al.*, 1999).

YKL-40 modula la morfología de células endoteliales vasculares promoviendo la formación de túbulos de ramificación, lo que indica que YKL-40 puede desempeñar un papel en la angiogénesis estimulando la migración y reorganización de células endoteliales vasculares (Malinda *et al.*, 1999). YKL-40 es también un factor de migración y adhesión para células de músculo liso vascular (Nishikawa *et al.*, 2003). Se ha sugerido que YKL-40 puede afectar a

las concentraciones de hialuronano extracelular locales disponibles para la unión celular por medio de dos mecanismos independientes: uniéndose al hialuronano extracelular e interfiriendo con la síntesis y secreción de hialuronano por las células. Por tanto, YKL-40 puede influir en el grado de migración y adhesión celular durante los procesos de remodelación tisular que tienen lugar durante la inflamación, fibrosis, aterogénesis y crecimiento del cáncer y metástasis del cáncer.

En ratones, YKL-40 se denominó “proteína de regresión mamaria (Brp-39)” porque la expresión de la proteína se indujo en células epiteliales mamarias unos cuantos días tras el destete. Se propuso (Mohanty *et al.*, 2003) que YKL-40 está implicada en la regulación de la muerte celular programada durante la involución mamaria como factor de señalización protector que determina qué células van a sobrevivir a la remodelación tisular drástica que se produce durante la involución.

YKL-40 se expresa por diferentes tipos de células *in vitro* e *in vivo*, en particular en tejidos caracterizados por inflamación, degradación/remodelación de la matriz extracelular o fibrogénesis en curso. YKL-40 se secreta por neutrófilos activados (Volck *et al.*, 1998), por macrófagos durante el estado tardío de diferenciación (Kirckpatrick *et al.*, 1997; Krause *et al.* 1996; Rehli *et al.*, 1997; Renkema *et al.*, 1998; Rehli *et al.*, 2003), condrocitos artríticos (Hakala *et al.*, 1993; Johansen *et al.* 2001; Volck *et al.* 2001), células de músculo liso vascular diferenciadas (Shackelton *et al.*, 1995; Malinda *et al.*, 1999; Nishikawa *et al.* 2003) y células sinoviales similares a fibroblastos (Hakala *et al.* 1993; Nyirkos *et al.*, 1990; Dasuri *et al.*, 2004). Estudios en condrocitos fetales humanos indican que YKL-40 es un marcador de diferenciación (Imabayashi *et al.*, 2003). *In vivo*, se encuentra expresión de ARNm y proteínas de YKL-40 en una subpoblación de macrófagos en membrana sinovial inflamada (Kirckpatrick *et al.*, 1997; Baeten *et al.*, 2000; Volck *et al.*, 2001), placas ateromatosas (Boot *et al.* 1999), vasos con arteritis de pacientes con arteritis de células gigantes (Johansen *et al.*, 1999a) y por condrocitos artríticos (Volck *et al.*, 2001), y macrófagos peritumorales en biopsias de cáncer de pulmón de células pequeñas que expresan ARNm de YKL-40 (Junker *et al.*, 2005b).

Se ha mostrado que una fuerte expresión de ARNm de YKL-40 en hígado humano está asociada con la presencia de fibrosis: Estudios inmunohistoquímicos de biopsias hepáticas han mostrado la expresión de la proteína YKL-40 en zonas del hígado con fibrosis, mientras que no se observó expresión en hepatocitos (Johansen *et al.*, 1997; Johansen *et al.* 2000). El análisis de hibridación sustractiva por supresión y la RT-PCR han demostrado que YKL-40 es una de las proteínas más sobreexpresadas en tejido hepático cirrótico provocado por el virus de la hepatitis C (VHC) (Shackel *et al.*, 2003).

Los pacientes con enfermedades no malignas caracterizadas por inflamación y fibrosis tales como artritis reumatoide activa (Johansen *et al.*, 1993; Harvey *et al.*, 1998; Johansen *et al.*, 1999b; Volck *et al.*, 2001), infecciones bacterianas graves (Nordenbaek *et al.*, 1999; Kronborg *et al.*, 2002), enfermedad inflamatoria del intestino activa (Koutroubakis *et al.*, 2003; Vind *et al.*, 2003) y fibrosis hepática (Johansen *et al.*, 1997; Johansen *et al.*, 2000; Tran *et al.*, 2000; Nøjgaard *et al.*, 2003) tienen YKL-40 sérica elevada.

YKL-40 se expresa y secreta por varios tipos de carcinomas humanos (de mama, de colon, de pulmón, de riñón, de ovario, de próstata, de útero, osteosarcoma, oligodendroglioma, glioblastoma y tumores de células germinales) (una búsqueda de la secuencia de YKL-40 en la base de datos *dbest* en el Centro Nacional de Información Biotecnológica; Johansen *et al.*, 1992; Junker *et al.*, 2005a), y por tumores mamarios murinos iniciados por oncogenes *neu/ras* (Morrison *et al.*, 1994). Los análisis genéticos de microalineamientos han identificado el gen de YKL-40 como uno de los genes más sobreexpresados en carcinoma de tiroides papilar (Huang *et al.*, 2001), gliomas malignos de alto grado (Tanwar *et al.*, 2002), y condrosarcoma mixoide extracelular (Sjogren *et al.*, 2003). YKL-40 se expresa y secreta *in vitro* por la línea celular de osteosarcoma MG63, células de glioblastoma y líneas celulares de leucemia mieloide (U937, THP-1, HL-60) (Johansen *et al.*, 1992; Rehli *et al.*, 2003; Kirckpatrick *et al.*, 1995; Verhoeckx *et al.*, 2004). YKL-40 no se expresa por líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas ni *in vitro* ni *in vivo* aunque se expresa fuertemente por macrófagos asociados a tumores en biopsias de cáncer de pulmón de células pequeñas (Junker *et al.*, 2005b).

Varios estudios han notificado un elevado nivel de proteína YKL-40 en el suero de pacientes con cáncer (Johansen *et al.*, 1995; Cintin *et al.*, 1999; Cintin *et al.*, 2002; Tanwar *et al.*, 2002; Brasso *et al.*, 2003; Dehn *et al.*, 2003; Geertsen *et al.*, 2003; Høgdall *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2003; Johansen *et al.*, 2003; Dupont *et al.*, 2004; Johansen *et al.*, 2004). Varios estudios han demostrado que una concentración sérica elevada de YKL-40 en pacientes con carcinomas de mama, colorrectal, de ovarios, de riñón, de pulmón de células pequeñas y de próstata es un parámetro de pronóstico independiente de supervivencia global corta e intervalo libre de recaída corto. Esta observación se ha realizado en pacientes con cáncer local o avanzado en el momento del primer diagnóstico del cáncer y en el momento de la recidiva (Johansen *et al.*, 1995; Cintin *et al.*, 1999; Cintin *et al.*, 2002; Brasso *et al.*, 2003; Dehn *et al.*, 2003; Geertsen *et al.*, 2003; Høgdall *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2003; Johansen *et al.*, 2003; Dupont *et al.*, 2004; Johansen *et al.*, 2004). Basándose en estos y otros hallazgos, se ha sugerido que YKL-40 es un marcador de diagnóstico de la presencia o ausencia de un cáncer y para el pronóstico de la recaída del cáncer y la supervivencia de pacientes con cáncer (documento WO 00/19206), y se describió como un marcador para la degradación de tejido conjuntivo y se usó en métodos para identificar la presencia de una enfermedad asociada con la degradación de tejido conjuntivo (por ejemplo cáncer) descritos (documentos WO 95/01995; US 5.935.798).

Ambos grupos de estos últimos métodos se basan en el empleo de un anticuerpo anti-YKL-40 para detectar la proteína en muestras de los pacientes.

Se conocen desde hace mucho en la técnica anticuerpos contra YKL-40 y se usan por ejemplo para la detección y monitorización del nivel de YKL-40 en plasma/suero sanguíneo de pacientes con cáncer, sin embargo, no se han producido ni descrito anticuerpos anti-YKL-40 funcionales, que puedan inhibir la función de YKL-40.

Bibliografía

- Baeten D, Boots AMH, Steenbakkens PGA, Elewaut D, Bos E, Verheijden GFM, Verbruggen G, Miltenburg AMM, Rijnders AWM, Veys EM, De Keyser F. Human cartilage gp-39+, CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium. Correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 1233-1243, 2000.
- 10 Boot RG, van Achterberg TAE, van Aken BE, Renkema GH, Jacobs MJHM, Aerts JMFG, de Vries CJM. Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis. Chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 687-694, 1999.
- Brasso K, Johansen JS, Christensen IJ, Teisner B, Price PA, Iversen P. High serum levels of PINP, bone alkaline phosphatase and YKL-40 in patients with advanced prostate carcinoma are associated with short survival. Meeting Proceedings of ASCO 2003; 22: resumen 1525.
- 15 Cintin C, Johansen JS, Christensen IJ, Price PA, Sørensen S, Nielsen HJ. Serum YKL-40 and colorectal cancer. *Brit J Cancer*, 79:1494-1499, 1999.
- Cintin C, Johansen JS, Christensen IJ, Price PA, Sørensen S, Nielsen HJ. High serum YKL-40 level after surgery for colorectal carcinoma is related to short survival. *Cancer*, 95: 267-274, 2002.
- 20 Coulson AF. A proposed structure for 'family 18' chitinases. A possible function for narbonin. *FEBS Lett*, 354: 41-4, 1994.
- Dasuri K, Antonovici M, Chen K, Wong K, Standing K, Ens W, El-Gabalawy H, Wilkins JA. The synovial proteome: analysis of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther*, 6:R161-8, 2004.
- 25 De Ceuninck F, Gauffillier S, Bonnaud A, Sabatini M, Lesur C, Pastoureau P. YKL-40 (cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 285: 926-931, 2001.
- Dehn H, Høgdall EVS, Johansen JS, Price PA, Jørgensen M, Engelholm SAA, Høgdall CK. Plasma YKL-40, as a prognostic tumor marker in recurrent ovarian cancer. *Acta Obstet Gynaecol Scand*, 82: 287-293, 2003.
- 30 Dupont J, Tanwar MK, Thaler HT, Fleisher M, Kauff N, Hensley ML, Sabbatini P, Anderson S, Aghajanian C, Holland EC, Spriggs DR. Early detection and prognosis of ovarian cancer using serum YKL-40. *J Clin Oncol*, 22:3330-9, 2004.
- Fusetti von Moeller H, Houston D, Rozeboom HJ, Dijkstra BW, Boot RG, Aerts JM, van Aalten DM. Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem*, 277:25537-44,2002
- 35 Fusetti F, Pijning T, Kalk KH, Bos E, Dijkstra BW. Crystal structure and carbohydrate binding properties of the human cartilage glycoprotein-39. *J Biol Chem*, 278: 37753-37760, 2003.
- Geertsen P, Johansen JS, von der Maase H, Jensen BV, Price PA. High pretreatment serum level of YKL-40 is related to short survival in patients with advanced renal cell carcinoma treated with high-dose continuous intravenous infusion of interleukin-2. Meeting Proceedings of ASCO 2003;22: resumen 1603.
- 40 Gregoire M, Lieubeau B. The role of fibroblasts in tumor behavior. *Cancer Met Rev*, 14: 339-350, 1995.
- Harvey S, Weisman M, O'Dell J, Scott T, Krusemeier M, Visor J, Swindlehurst C. Chondrex: new marker of joint disease. *Clin Chem*, 44: 509-516, 1998.
- Houston DR, Recklies AD, Krupa JC, van Aalten DMF. Structure and ligand-induced conformational change of the 39-kDa glycoprotein from human articular chondrocytes. *J Biol Chem*, 278: 30206-30212, 2003.
- 45 Huang AND, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, LiVolsi V, Frankel W, Kloos RT, Eng C, Pellegata NS, de la Chapelle A. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 15044-15049, 2001.
- Høgdall EVS, Johansen JS, Kjaer SK, Price PA, Christensen L, Blaakaer J, Bock JE, Glud E, Høgdall CK. High plasma YKL-40 level in patients with ovarian cancer stage III is related to shorter survival. *Oncol Rep*, 10: 1535-1538,

2003.

Imabayashi H, Mori T, Gojo S, Kiyono T, Sugiyama T, Irie R, Isogai T, Hata J, Toyama AND, Umezawa A. Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp Cell Res*, 288:35-50, 2003.

- 5 Jensen BV, Johansen JS, Price PA. High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 9: 501-512, 2003.

Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, Price PA. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res*, 7: 501-512, 1992.

- 10 Johansen JS, Jensen HS, Price PA. A new biochemical marker for joint injury. Analysis of YKL-40 in serum and synovial fluid. *Br J Rheumatol*, 32: 949-955, 1993.

Johansen JS, Cinton C, Jørgensen M, Kamby C, Price PA. Serum YKL-40: a new potential marker of prognosis and location of metastases of patients with recurrent breast cancer. *Eur J Cancer*, 31A: 1437-1442, 1995.

Johansen JS, Moller S, Price PA, Bendtsen F, Junge J, Garbarsch C, Henriksen JH. Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis? *Scand J Gastroenterol*, 32: 582-90, 1997.

- 15 Johansen JS, Baslund B, Garbarsch C, Hansen M, Stoltenberg M, Lorenzen I, Price PA. YKL-40 in giant cells and macrophages from patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*, 42: 2624-2630, 1999a.

Johansen JS, Stoltenberg M, Hansen M, Florescu A, Hørslev-Petersen K, Lorenzen I, Price PA. Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Rheumatology*, 38: 618-626, 1999b.

- 20 Johansen JS, Christoffersen P, Møller S, Price PA, Henriksen JH, Garbarsch C, Bendtsen F. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *J Hepatol*, 32: 911-920, 2000.

Johansen JS, Olee T, Price PA, Hashimoto S, Ochs RL, Lotz M. Regulation of YKL-40 production by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 44: 826-837, 2001.

- 25 Johansen JS, Christensen IJ, Riisbro R, Greenall M, Han C, Price PA, Smith K, Brüner N, Harris AL. High serum YKL-40 levels in patients with primary breast cancer is related to short recurrence free survival. *Breast Cancer Res Treat*, 80: 15-21, 2003.

Johansen JS, Drivsholm L, Price PA, Christensen IJ. High serum YKL-40 level in patients with small cell lung cancer is related to early death. *Lung Cancer*, 46:333-40, 2004.

Junker N, Johansen JS, Hansen LT, Lund EL, Kristjansen PEG. Differential regulation of YKL-40 during genotoxic or microenvironmental stress in three human glioblastoma cell lines. *Cancer Science* 2005a, en prensa.

- 30 Junker N, Johansen JS, Andersen CB, Kristjansen PEG. Expression of YKL-40 by peritumoral macrophages in human small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2005b, en prensa.

Kirkpatrick RB, Matico RE, McNulty DE, Strickler JE, Rosenberg M. An abundantly secreted glycoprotein from *Drosophila melanogaster* is related to mammalian secretory proteins produced in rheumatoid tissues and by activated macrophages. *Gene*, 153:147-54, 1995.

- 35 Kirkpatrick RB, Emery JG, Connor JR, Dodds R, Lysko PG, Rosenberg M. Induction and expression of human cartilage glycoprotein 39 in rheumatoid inflammatory and peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Exp Cell Res*, 237:46-54, 1997.

Koutroubakis IE, Petinaki E, Dimoulios P, Vardas E, Roussomoustakaki M, Maniatis AN, Kouroumalis EA. Increased serum levels of YKL-40 in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*, 18:287-293, 2003.

- 40 Kronborg G, Østergaard C, Weis N, Nielsen H, Obel N, Pedersen SS, Price PA, Johansen JS. Serum level of YKL-40 is elevated in patients with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia and is associated to the outcome of the disease. *Scand J Infect Dis*, 34:323-326, 2002.

- 45 Malinda KM, Ponce L, Kleinman HK, Shackelton LM, Millis AJT. Gp38k, a protein synthesized by vascular smooth muscle cells, stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *Exp Cell Res*, 250: 168-173, 1999.

Mohanty AK, Singh G, Paramasivam M, Saravanan K, Jabeen T, Sharma S, Yadav S, Kaur P, Kumar P, Srinivasan A, Singh TP. Crystal structure of a novel regulatory 40 kDa mammary gland protein (MGP-40) secreted during involution. *J Biol Chem*, 278: 14451-14460, 2003.

- Morrison BW and Leder P. *c-myc* and *ras* initiate murine mammary tumors that share genetic markers generally absent in *c-myc* and *int-2*-initiated tumors. *Oncogene*, 9: 3417-3426, 1994.
- 5 Nordenbaek C, Johansen JS, Junker P, Borregaard N, Sørensen O and Price PA. YKL-40, a matrix protein of specific granules in neutrophils, is elevated in serum of patients with community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *J Infect Dis*, 180: 1722-1726, 1999.
- Nishikawa KC, Millis AJT. gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells. *Exp Cell Res*, 287: 79-87, 2003.
- Nyirkos P, Golds EE. Human synovial cells secrete a 39 kDa protein similar to a bovine mammary protein expressed during the non-lactating period. *Biochem J*, 269:265-8, 1990.
- 10 Nøjgaard C, Johansen JS, Christensen E, Skovgaard LT, Price PA, Becker U and The EMALD Group. Serum levels of YKL-40 and PIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol*, 39: 179-186, 2003.
- Recklies AD, White C, Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem J*, 365: 119-126, 2002.
- 15 Rehli M, Krause SW, Andreesen R. Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics*, 43: 221-225, 1997.
- Rehli M, Niller H-H, Ammon C, Langmann S, Schwarzfischer L, Andreesen R, Krause SW. Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation. *J Biol Chem*, 278: 44058-44068, 2003.
- 20 Renkema GH, Boot GR, Au FL, Donker-Koopman WE, Strijland A, Muijsers AO, Hrebicek M, Aerts JMFG. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem*, 251: 504-509, 1998.
- Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, Gorrell MD, McCaughan GW. Novel differential gene expression in human cirrhosis detected by suppression subtractive hybridization. *Hepatology*, 38:577-88, 2003.
- 25 Shackelton LM, Mann DM, Millis AJ. Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling. *J Biol Chem*, 270:13076-83, 1995.
- Sjogren H, Meis-Kindblom JM, Orndal C, Bergh P, Ptaszynski K, Aman P, Kindblom LG, Stenman G. Studies on the molecular pathogenesis of extraskeletal myxoid chondrosarcoma-cytogenetic, molecular genetic, and cDNA microarray analyses. *Am J Pathol*, 162: 781-792, 2003.
- 30 Sun YJ, Chang NC, Hung SI, Chang AC, Chou CC, Hsiao CD. The crystal structure of a novel mammalian lectin, Ym1, suggests a saccharide binding site. *J Biol Chem* 276:17507-14, 2001.
- Tanwar MK, Gilbert MR, Holland EC. Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma. *Cancer Res*, 62: 4364-4368, 2002.
- 35 Tran A, Benzaken S, Saint-Paul M-C, Guzman-Granler E, Hastier P, Pradier C, Barjoan EM, Demuth N, Longo F, Rampal P. Chondrex (YKL-40), a potential new serum fibrosis marker in patients with alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 12:989-993, 2000.
- Varela PF, Llera AS, Mariuzza RA, Tormo J. Crystal structure of imaginal disc growth factor-2. A member of a new family of growth-promoting glycoproteins from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 277:13229-36, 2002.
- 40 Verhoeckx KC, Bijlsma S, de Groene EM, Witkamp RF, van der Greef J, Rodenburg RJ. A combination of proteomics, principal component analysis and transcriptomics is a powerful tool for the identification of biomarkers for macrophage maturation in the U937 cell line. *Proteomics*, 4:1014-28, 2004.
- Volck B, (Johansen JS, Stoltenberg M, Garbarsch C, Price PA, Østergaard M, Ostergaard K, Løvgreen-Nielsen P, Sonne-Holm S, Lorenzen I. Studies on YKL-40 in knee joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Involvement of YKL-40 in the joint pathology. *Osteoarthritis Cartilage*, 9: 203-214, 2001.
- 45 Volck B, Price PA, Johansen JS, Sørensen O, Benfield TL, Nielsen HJ, Calafat J, Borregaard N. YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proc Assoc Am Phys*, 110: 351-360, 1998.

Sumario de la invención.

La presente invención se refiere a un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo, que es específico para YKL-40 humana (SEQ ID NO: 1), pudiendo dicho anticuerpo, fragmento de unión o proteína recombinante del mismo inhibir el crecimiento de una célula tras su unión a un epítipo en YKL-40, siendo la célula una célula cancerosa que expresa YKL-40.

5 Por tanto, en un aspecto la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-YKL-40 humana monoclonal, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo, pudiendo dicho anticuerpo, fragmento de unión o proteína recombinante del mismo

- 10 - inhibir el crecimiento celular, tal como por ejemplo el crecimiento de células endoteliales, fibroblastos, sinoviocitos, condrocitos, células estrelladas hepáticas, células de músculo liso vascular, monocitos/macrófagos o células cancerosas, y/o,
- inducir la muerte celular, tal como por ejemplo la muerte de células endoteliales, fibroblastos, sinoviocitos, condrocitos, células estrelladas hepáticas, células de músculo liso vascular, monocitos/macrófagos o células cancerosas, y/o
- 15 - inhibir la diferenciación celular, tal como por ejemplo la diferenciación de células endoteliales, fibroblastos, sinoviocitos, condrocitos, células estrelladas hepáticas, células de músculo liso vascular, monocitos/macrófagos o células cancerosas, y/o
- inhibir el potencial metastásico de células cancerosas.

20 Un anticuerpo anti-YKL-40 humana monoclonal según la invención puede inhibir la actividad funcional de YKL-40 humana asociada con el crecimiento, la diferenciación, la supervivencia celulares y la remodelación del tejido extracelular. En particular, la invención se refiere a un anticuerpo que puede inhibir la actividad biológica de YKL-40 en el

- desarrollo/progresión del crecimiento de células cancerosas, y/o
- desarrollo/progresión de la metástasis de células cancerosas, y/o
- desarrollo/progresión de la diferenciación de células cancerosas, y/o
- 25 - desarrollo/progresión de la supervivencia de células cancerosas, y/o
- desarrollo/progresión de la angiogénesis, y/o
- desarrollo/progresión de la remodelación de la matriz extracelular, y/o
- desarrollo/progresión de la fibrosis hepática, y/o
- desarrollo/progresión de la fibrosis pulmonar, y/o
- 30 - desarrollo/progresión de la fibrosis tisular, y/o
- desarrollo/progresión de la fibrosis de órganos, y/o
- desarrollo/progresión de la artritis reumatoide.

La invención muestra un anticuerpo que puede inhibir la función biológica de YKL-40 en el proceso mencionado anteriormente tras su unión a un epítipo específico en YKL-40.

35 Por tanto, en aspectos adicionales la invención se refiere a un epítipo que puede reconocerse por los anticuerpos anteriores. Un epítipo de la invención se caracteriza porque comprende los restos de aminoácido de la secuencia identificada en el presente documento como SEQ ID NO: 5. Según la invención, dicho epítipo es un sitio de unión, constituye una parte de un sitio de unión de YKL-40 a su receptor, o está implicado en ayudar a la activación del receptor por YKL-40 interaccionando con algunas otras moléculas, por ejemplo un ligando de YKL-40, tal como por

40 ejemplo heparina, sulfato de heparán, proteoglicanos o hialuronano. El uso de un anticuerpo que puede reconocer el epítipo tal como se definió anteriormente para la

- i) inhibición del crecimiento celular (incluyendo cáncer) y/o
- ii) inhibición de la diferenciación celular (incluyendo cáncer) y/o
- iii) inhibición de la supervivencia celular (incluyendo cáncer) y/o
- 45 iv) inducción de la muerte celular (incluyendo cáncer) y/o
- v) inhibición del desarrollo/progresión de la remodelación de la matriz extracelular, y/o

- vi) inhibición del desarrollo/progresión de la fibrosis hepática, y/o
- vii) inhibición del desarrollo/progresión de la artritis reumatoide, y/o
- viii) inhibición del desarrollo/progresión de la fibrosis de órganos, y/o
- ix) inhibición del desarrollo/progresión de la fibrosis tisular, y/o
- 5 x) inhibición del desarrollo/progresión de la angiogénesis, y/o
- xi) inhibición de la metástasis

también es un aspecto de la invención. La invención muestra en particular usos de los anticuerpos para el tratamiento de cáncer y/o enfermedades no malignas, tales como por ejemplo enfermedades inflamatorias y fibrosis.

10 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo anteriores.

La invención también se refiere a secuencias peptídicas que comprenden o que están comprendidas en el epítipo para la

- i) producción de un anticuerpo de la invención, y/o
- 15 ii) modulación de la actividad funcional del receptor de YKL-40 asociado con la proliferación, diferenciación y supervivencia celulares, y/o
- iii) modulación de funciones biológicas de YKL-40, y/o
- iv) fabricación de un medicamento.

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y/o secuencias peptídicas tal como se definieron anteriormente.

20 Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el efecto de diferentes anticuerpos monoclonales contra YKL-40 humana (AcM 115F9, 116F9 y 201F9) sobre el crecimiento y supervivencia celulares de células de glioblastoma humano maligno U87 *in vitro* (ensayo de MTT). Los resultados se facilitan como el valor medio de 6 mediciones +/- desviación estándar.

25 La figura 2 demuestra el efecto inhibitor del AcM 116F9 sobre el crecimiento y supervivencia celulares de células de osteosarcoma humano U2OS y MG-63 y células de melanoma maligno humano SK-MEL-28 *in vitro* (ensayo de MTT). Los resultados se facilitan como el valor medio de 6 mediciones +/- desviación estándar.

30 La figura 3 muestra los gráficos de Kaplan-Meier del crecimiento de tumores individuales (días hasta alcanzar un tamaño tumoral de 600 mm³) en ratones desnudos a los que se les inyectaron células de glioblastoma humano U87 y se trataron con anticuerpo monoclonal (AcM) 201 F9, 116F9 o solución salina tamponada con fosfato (PBS) (control).

35 La figura 4 presenta los gráficos de Kaplan Meier del crecimiento de tumores individuales (días hasta alcanzar un tamaño tumoral de 600 mm³) en ratones desnudos a los que se les inyectaron células de glioblastoma humano U87 y se trataron con radiación ionizante (IR), anticuerpo monoclonal 201 F9 (AcM), simultáneamente con radiación ionizante y anticuerpo monoclonal 201 F9 (IR+AcM) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) (control). Diez ratones en cada grupo.

La figura 5 muestra una presentación esquemática de la ubicación de secuencias peptídicas que comprenden el epítipo para el AcM 201 F9 (SEQ ID NO: 2-7) en la estructura tridimensional de YKL-40.

Descripción detallada de la invención

Anticuerpo

40 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo que pueda reconocer y unirse selectivamente a un epítipo en YKL-40 humana que comprende al menos una de las secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:2-7 y de ese modo inhibir la actividad biológica de YKL-40 asociada con procesos de crecimiento celular, diferenciación celular, supervivencia celular y remodelación del tejido extracelular.

45 Las moléculas de anticuerpo pertenecen a una familia de proteínas plasmáticas denominadas inmunoglobulinas, cuyo elemento estructural básico, el dominio o pliegue de inmunoglobulina, se usa en diversas formas en muchas

moléculas del sistema inmunitario y otros sistemas de reconocimiento biológico. Una inmunoglobulina típica tiene cuatro cadenas polipeptídicas, que contienen una región de unión a antígeno conocida como región variable y una región que no varía conocida como región constante.

5 Las inmunoglobulinas y los anticuerpos nativos son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios separados regularmente. Cada cadena pesada tiene, en un extremo, un dominio variable (VH) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácido particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de la cadena ligera y pesada (Novotny J, & Haber E. Proc Natl Acad Sci USA. 82(14):4592-6, 1985).

15 Dependiendo de las secuencias de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay al menos cinco (5) clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa (α), delta (δ), epsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), respectivamente. Las cadenas ligeras de anticuerpos pueden asignarse a uno de dos tipos claramente diferenciados, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Se conocen bien las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

25 El término "variable" en el contexto de dominio variable de anticuerpos, se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren en gran medida en cuanto a su secuencia entre anticuerpos. Los dominios variables son para la unión y determinan la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada.

30 Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan el entramado (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones de FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectada por tres CDR, que forman bucles que conectan y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha mediante las regiones de FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

40 Por tanto, un anticuerpo que se contempla para su uso en la presente invención puede estar en cualquiera de una variedad de formas, incluyendo una inmunoglobulina completa, un fragmento de anticuerpo tal como Fv, Fab y fragmentos similares, un anticuerpo de cadena sencilla que incluye las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los dominios variables y formas similares, todas las cuales se encuentran bajo el término amplio "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento. La presente invención contempla el uso de cualquier especificidad de un anticuerpo, policlonal o monoclonal, y no se limita a anticuerpos que reconocen e inmunoreaccionan con un antígeno específico. En realizaciones preferidas, en el contexto de los métodos tanto de selección como terapéuticos descritos a continuación, se usa un anticuerpo o fragmento del mismo que es inmuno-específico para un antígeno o epítipo de la invención.

50 La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región variable o de unión a antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados el fragmento Fab, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, así denominado por su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos fragmentos de unión a antígeno que pueden reticular el antígeno, y otro fragmento residual (que se denomina pFc'). Fragmentos adicionales pueden incluir diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Tal como se usa en el presente documento, "fragmento funcional" con respecto a anticuerpos se refiere a fragmentos Fv, F(ab) y F(ab')₂.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se usa en el presente documento de manera intercambiable con la expresión "fragmento de unión a antígeno".

Los fragmentos de anticuerpo pueden tener tan sólo aproximadamente 4 aminoácidos, 5 aminoácidos, 6

- aminoácidos, 7 aminoácidos, 9 aminoácidos, aproximadamente 12 aminoácidos, aproximadamente 15 aminoácidos, aproximadamente 17 aminoácidos, aproximadamente 18 aminoácidos, aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 25 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos o más. En general, un fragmento de anticuerpo de la invención puede tener cualquier límite de tamaño superior siempre que tenga propiedades similares o inmunológicas en relación con un anticuerpo que se une con especificidad a un epítipo que comprende los restos de aminoácido 83-90, 96-105, 137-150, 210-220, 304-314 y/o 318-329 de la SEQ ID NO: 1, o una secuencia peptídica seleccionada de cualquiera de las secuencias identificadas en el presente documento como SEQ ID NO: 2-7, o un fragmento de dichas secuencias. Por tanto, en el contexto de la presente invención, la expresión "fragmento de anticuerpo" es idéntica a la expresión "fragmento de unión a antígeno".
- 5
- 10 Los fragmentos de anticuerpo conservan cierta capacidad para unirse selectivamente con su antígeno o receptor. Algunos tipos de fragmentos de anticuerpo se definen tal como sigue:
- (1) Fab es el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo. Puede producirse un fragmento Fab mediante digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una parte de una cadena pesada.
- 15 (2) Fab' es el fragmento de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido por reducción, para producir una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada. Se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo.
- Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos cuantos restos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo.
- 20 (3) (Fab')₂ es el fragmento de un anticuerpo que puede obtenerse tratando un anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior.
- (4) F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos mediante dos enlaces disulfuro.
- Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión y reconocimiento de antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada en una asociación estrecha, no covalente (dímero V_H - V_L). Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L. En conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque a una afinidad inferior que el sitio de unión entero.
- 25
- 30 (5) Anticuerpo de cadena sencilla ("SCA"), definido como una molécula modificada por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unidas mediante un ligador polipeptídico adecuado como una molécula de cadena sencilla genéticamente fusionada. Tales anticuerpos de cadena sencilla también se denominan "Fv de cadena sencilla" o fragmentos de anticuerpo "sFv". Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios VH y VL y permite que el sFv forme la estructura deseada para su unión a antígeno. Para una revisión véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* 113: 269-315 Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, NY, 1994.
- 35
- El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza que los dominios se apareen con los dominios complementarios de otra cadena y se creen dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 93/11161, y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).
- 40
- 45 La invención contempla tanto un anticuerpo policlonal como uno monoclonal contra YKL-40 humana, fragmentos de unión a antígeno y proteínas recombinantes del mismo que posee al menos una actividad funcional según la invención.
- Los expertos en la técnica conocen bien la preparación de anticuerpos policlonales. Véase, por ejemplo, Green *et al.* 1992. *Production of Polyclonal Antisera*, en: *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), páginas 1-5 (Humana Press); Coligan, *et al.*, *Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats Mice and Hamsters*, en: *Current Protocols in Immunology*, sección 2.4.1.
- 50
- La preparación de anticuerpos monoclonales es asimismo convencional. Véanse, por ejemplo, Kohler & Milstein, *Nature*, 256:495-7 (1975); Coligan, *et al.*, secciones 2.5.1-2.6.7; y Harlow, *et al.*, en: *Antibodies: A Laboratory Manual*, página 726, Cold Spring Harbor Pub. (1988). Pueden aislarse y purificarse anticuerpos monoclonales a partir de cultivos de hibridoma mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Tales técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína-A Sepharose, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía
- 55

de intercambio iónico. Véanse, por ejemplo, Coligan, *et al.*, secciones 2.7.1-2.7.12 y secciones 2.9.1-2.9.3; Barnes, *et al.*, Purification of Immunoglobulin G (IgG). En: *Methods in Molecular Biology*, 1992, 10:79-104, Humana Press, NY.

5 Los expertos en la técnica conocen bien métodos de manipulación *in vitro* e *in vivo* de anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256, 495-7, o pueden prepararse mediante métodos recombinantes, por ejemplo, tal como se describe en el documento US 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales para su uso con la presente invención también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, 1991, *Nature* 352: 624-628, así como en Marks *et al.*, 1991, *J Mol Biol* 222: 581-597. Otro método implica humanizar un anticuerpo monoclonal por medios recombinantes para generar anticuerpos que contienen secuencias reconocibles y específicas humanas. Véase, para una revisión, Holmes, *et al.*, 1997, *J Immunol* 158:2192-2201 y Vaswani, *et al.*, 1998, *Annals Allergy, Asthma & Immunol* 81:105-115.

15 La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen de manera natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraposición a preparaciones de anticuerpos policlonales convencionales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan mediante el cultivo de hibridomas, sin contaminarse por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo tal como se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular.

25 Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particulares, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son idéntica(s) u homóloga(s) a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (documento US 4.816.567); Morrison *et al.*, 1984, *Proc Natl Acad Sci* 81: 6851-6855.

35 También se conocen en la técnica métodos de preparación de fragmentos de anticuerpo (véase por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1988). Pueden prepararse fragmentos de anticuerpo de la presente invención mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en *E. coli* de ADN que codifica para el fragmento. Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo mediante métodos convencionales de digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de anticuerpo mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento de 5 S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' de 3,5 S. Alternativamente, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en los documentos US 4.036.945 y US 4.331.647, y referencias contenidas en los mismos.

45 También pueden usarse otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que se reconoce mediante el anticuerpo intacto. Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser no covalente o las cadenas variables pueden unirse mediante un enlace disulfuro intermolecular o reticularse mediante compuestos químicos tales como glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas mediante un ligador peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de cadena sencilla (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican para los dominios V_H y V_L conectadas por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula huésped tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido ligador que forma un puente entre los dos dominios V. Se describen métodos para producir sFv, por ejemplo, por Whitlow, *et al.*, 1991, en: *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 2:97; Bird *et al.*, 1988, *Science* 242:423-426; documento US 4.946.778; y Pack, *et al.*, 1993, *Bio-Technology* 11:1271-77.

55 Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica para una única región determinante de complementariedad (CDR). Los péptidos de CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") a menudo están implicados en el reconocimiento y unión al antígeno. Pueden obtenerse péptidos de CDR clonando o construyendo genes que codifican para la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, usando la

reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir de ARN de células que producen anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick, *et al.*, *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, vol. 2, página 106 (1991).

5 La invención contempla formas humanas y humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos). Tales anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana, tal como la secuencia de reconocimiento de epítomos. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se reemplazan restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. Anticuerpo(s) humanizado(s) que contiene(n) una(s) secuencia(s) mínima(s) de anticuerpo(s) de la invención, tal como una(s) secuencia(s) que reconoce(n) el/los epítomo(s) descrito(s) en el presente documento, es/son una realización preferida de la invención. En particular, la invención se refiere a formas humanizadas de los anticuerpos monoclonales de ratón 201 F9 y 116F9 anti-YKL-40 humana.

15 En algunos casos, se reemplazan restos de entramado de Fv de la inmunoglobulina humana por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de entramado o CDR importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, los anticuerpos humanizados comprenderán sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase: Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321, 522-525; Reichmann *et al.*, 1988, *Nature* 332, 323-329; Presta, 1992, *Curr Op Struct Biol* 2:593-596; Holmes *et al.*, 1997, *J Immunol* 158:2192-2201 y Vaswani, *et al.*, 1998, *Annals Allergy, Asthma & Immunol* 81:105-115.

La generación de anticuerpos puede lograrse mediante cualquier método convencional en la técnica para producir anticuerpos policlonales y monoclonales usando un polipéptido de YKL-40 humana natural o recombinante o fragmentos del mismo como antígeno. Tales anticuerpos se generarán en una realización preferida usando una YKL-40 humana producida de manera recombinante o que se produce de manera natural (n.º de registro de Swissprot: P36222) identificada en el presente documento como SEQ ID NO: 1, o variantes o fragmentos de la misma, o, en una realización más preferida, usando fragmentos de dichos polipéptidos, siendo dichos fragmentos fragmentos inmunogénicos que cumplen al menos dos de los siguientes criterios:

- (i) son una secuencia de aminoácidos contiguos de al menos 5 aminoácidos;
- 35 (ii) comprenden una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia identificada como SEQ ID NO: 1 o
- (iii) comprenden una secuencia de aminoácidos identificada en SEQ ID NO: 2-7, o un fragmento de la misma.

Los anticuerpos también pueden producirse *in vivo* por el individuo que va a tratarse, por ejemplo, administrando un fragmento inmunogénico según la invención a dicho individuo. Por consiguiente, la presente invención se refiere además a una vacuna que comprende un fragmento inmunogénico descrito anteriormente.

40 La solicitud también se refiere a un método para producir un anticuerpo de la invención, comprendiendo dicho método una etapa de proporcionar YKL-40 o un fragmento inmunogénico de YKL-40 descrito en el presente documento.

La invención se refiere a un anticuerpo, que puede inhibir la función biológica de YKL-40 en relación con el crecimiento, la diferenciación, la supervivencia celulares, el potencial metastásico y la remodelación tisular, tal como por ejemplo la remodelación de la matriz extracelular con desarrollo de fibrosis. En una realización, tal anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-YKL-40 humana, o fragmento de anticuerpo, o proteína recombinante del mismo, que puede unirse a un epítomo que comprende los restos de aminoácido 83-90, 96-105, 137-150, 210-220, 304-314 y/o 318-329 de la SEQ ID NO: 1, o una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 2-7, o un fragmento de dichas secuencias. Preferiblemente, el epítomo está ubicado dentro de la secuencia de YKL-40 (SEQ ID NO: 1)

50 En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, que no es un anticuerpo anti-YKL-40 humana, pudiendo dicho anticuerpo reconocer y unirse al epítomo que se reconoce por un anticuerpo anti-YKL-40 humana anterior.

Todavía en otra realización, la invención se refiere a un compuesto que no es un anticuerpo, que puede unirse al epítomo descrito en el presente documento y de ese modo inhibir la función de la proteína YKL-40 en asociación con

- desarrollo/progresión del crecimiento del cáncer, y/o
- 55 - desarrollo/progresión de la diferenciación del cáncer, y/o

- desarrollo/progresión de la supervivencia del cáncer, y/o
- desarrollo/progresión de la metástasis del cáncer, y/o
- desarrollo/progresión de la angiogénesis, y/o
- desarrollo/progresión de la remodelación de la matriz extracelular, y/o

- 5
- desarrollo/progresión de la fibrosis hepática, y/o
 - desarrollo/progresión de la fibrosis pulmonar, y/o
 - desarrollo/progresión de la fibrosis tisular, y/o
 - desarrollo/progresión de la fibrosis de órganos, y/o
 - desarrollo de la artritis reumatoide.

10 Mediante el término "epítipo" quiere decirse el grupo específico de átomos (en una molécula de antígeno) que se reconoce por anticuerpos (de ese antígeno) (provocando de ese modo una respuesta inmunitaria). El término "epítipo" es el equivalente a la expresión "determinante antigénico". El epítipo puede comprender 3 o más restos de aminoácido, tales como por ejemplo 4, 5, 6, 7, 8 restos de aminoácido, ubicados en proximidad estrecha, tal como dentro de una secuencia de aminoácidos contiguos, o ubicados en partes distantes de la secuencia de aminoácidos

15 de un antígeno, pero que debido al plegamiento de la proteína se han aproximado entre sí.

La invención se refiere a un epítipo que comprende al menos 3 restos de aminoácido seleccionados

1) de los restos de aminoácido 83-90, 96-105, 137-150, 210-220, 304-314 y/o 318-329 de la SEQ ID NO: 1;

2) que consisten en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 2-7, o un fragmento de la misma, o

3) que comprenden una combinación de restos de aminoácido derivados de cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2-7.

20

En una realización preferida, el epítipo está ubicado en YKL-40 humana, tiene de 3 a 6 restos de aminoácido y comprende restos de aminoácido G, A, W, S, R, T y/o K.

Preferiblemente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal contra YKL-40 humana caracterizado por la capacidad de reconocer y unirse al epítipo anterior.

25 Más particularmente, la invención se refiere preferiblemente al grupo de anticuerpos monoclonales de ratón anti-YKL-40 humana funcionalmente activos identificados en el presente documento como anticuerpos monoclonales 115F9, 116F9 y 201F9.

Según la invención, los anticuerpos 115F9, 116F9 y 201 F9 pueden unirse a un epítipo tal como se definió anteriormente y de ese modo inhibir la función de YKL-40 en relación con el crecimiento y la supervivencia celulares inhibiendo al menos una actividad biológica de la proteína YKL-40 descrita en el presente documento.

30

Anticuerpo funcionalmente activo

Por tanto, la presente invención se refiere a un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, o proteína recombinante del mismo, que puede reconocer un epítipo que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de cualquiera de las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 2-7, de fragmentos de las mismas,

35 pudiendo dicho anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante modular al menos una función biológica de YKL-40 humana o un homólogo funcional de YKL-40, o un fragmento funcional de la misma, estando asociada dicha actividad con i) crecimiento celular ii) supervivencia celular, iii) diferenciación celular iv) remodelación de la matriz extracelular, v) desarrollo de fibrosis hepática, vi) desarrollo de fibrosis tisular, vii) desarrollo de fibrosis de órganos, viii) desarrollo de angiogénesis, ix) desarrollo de artritis reumatoide, x) desarrollo de inflamación, y/o xi) desarrollo de metástasis.

40

En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-YKL-40 humana.

La expresión "crecimiento celular" se usa de manera intercambiable en el presente documento con la expresión "proliferación celular" y designa el fenómeno de un gran aumento en el número de células debido a división celular.

La expresión "supervivencia celular" designa el fenómeno de una célula que sigue viviendo o existiendo, especialmente tras casi morir o destruirse, o tras tratarse de manera inapropiada, por ejemplo con factores que afectan a la homeostasis celular de modo que se induce autodestrucción celular debida a apoptosis. La expresión "inhibición/estimulación de la supervivencia celular" se usa de manera intercambiable en el presente documento con

45

la expresión “estimulación/inhibición de la apoptosis/muerte celular”.

En el presente contenido, mediante la expresión “homólogo funcional de YKL-40” quiere decirse un polipéptido

- que comprende uno de los fragmentos inmunogénicos de YKL-40 humana definidos anteriormente,
- que puede realizar al menos una de las actividades biológicas de YKL-40 asociadas con crecimiento, supervivencia, diferenciación celulares, apoptosis, angiogénesis, remodelación de la matriz extracelular, desarrollo de metástasis, desarrollo de fibrosis hepática, desarrollo de fibrosis tisular, desarrollo de fibrosis de órganos, desarrollo de artritis reumatoide y/o desarrollo de inflamación
- que puede reconocerse por un anticuerpo de la invención, preferiblemente anticuerpo monoclonal 115F9, 116F9 y/o 201 F9.

En el presente contenido, mediante el término “modular” quiere decirse que un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, o una proteína recombinante del mismo, puede potenciar o disminuir la actividad biológica de YKL-40 humana, o un homólogo funcional de la misma, o un fragmento biológicamente activo de la misma. En una realización preferida, la invención muestra un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, o proteína recombinante del mismo, que puede modular al menos una actividad biológica de YKL-40, tal como estimular la proliferación celular, el crecimiento celular, la diferenciación celular, la supervivencia celular, la modulación de la adhesión y/o motilidad de células. En una realización preferida, las células son células tumorales. Las células tumorales son en una realización preferida células cancerosas o células malignas hematológicas. Las células cancerosas pueden ser de cualquier cáncer primario o metastásico.

Mediante “cáncer primario” quiere decirse un grupo de células tumorales, que han adquirido al menos un rasgo característico de células cancerosas, sin embargo no han invadido aún los tejidos vecinos y se mantienen juntas en un tumor localizado en el lugar de origen primario. Mediante “cáncer metastásico” quiere decirse un grupo de células tumorales que se originan a partir de las células de un cáncer primario, que han invadido el tejido que rodea a dicho cáncer primario, se han diseminado por el cuerpo y se han adherido en un nuevo lugar distante y han crecido formando un nuevo tumor.

Los ejemplos de cánceres primarios y metastásicos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de mama, colorrectal, de páncreas, de estómago, GIST, hepatocelular, de pulmón, de pulmón de células pequeñas, de ovarios, de útero, de cuello uterino, de vejiga, renal, de próstata, de testículos, de tiroides, melanoma maligno, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, glioblastoma u otros tumores cerebrales, de cabeza/cuello, otros carcinomas gastrointestinales y tumores de células germinales, y tumores malignos hematológicos.

Un anticuerpo funcional según la invención puede modular la proliferación, diferenciación y/o influir en la supervivencia celular de células cancerosas tanto primarias como metastásicas, inhibiendo preferiblemente el crecimiento/proliferación/diferenciación celulares de dichas células y/o induciendo/estimulando la apoptosis/muerte celular de dichas células. En otras realizaciones, los anticuerpos funcionales de la invención también pueden modular la proliferación y/o influir en la supervivencia celular de células no cancerosas tales como células endoteliales, fibroblastos, células sinoviales, condrocitos, células sanguíneas (por ejemplo monocitos/macrófagos, neutrófilos y precursores), células estrelladas hepáticas, músculo liso vascular, células epiteliales, puesto que se ha mostrado previamente que una actividad biológica de YKL-40 humana desempeña un importante papel en la estimulación de la proliferación y supervivencia de estas células. El ejemplo de tal actividad biológica de YKL-40 puede seleccionarse de, pero sin limitarse a, la capacidad de YKL-40 de

- i) unirse a quitina,
- ii) unirse a heparina,
- iii) unirse a sulfato de heparán,
- iv) unirse a hialuronano,
- v) unirse a oligosacáridos largos y/o cortos,
- vi) servir como factor de crecimiento celular,
- vii) servir como quimioatrayente para células,
- viii) interferir con la síntesis de hialuronano,
- ix) estimular rutas de transducción de señales asociadas con supervivencia celular,
- x) estimular la diferenciación,
- xi) estimular la angiogénesis,

- xii) estimular la fibrogénesis,
- xiii) estimular la remodelación de la matriz extracelular y/o
- xiv) estimular la inflamación.

5 Por tanto, un anticuerpo funcionalmente activo de la invención, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína recombinante del mismo, que reconoce específicamente un(os) epítipo(s) descrito(s) en el presente documento, puede modular cualquiera de las actividades biológicas anteriores de YKL-40, preferiblemente, cualquier actividad, que está asociada con los procesos que influyen en la proliferación o supervivencia celulares.

10 Los anticuerpos 115F9, 116F9 y 201 F9 son los anticuerpos funcionalmente activos preferidos de la invención que pueden modular una cualquiera de las actividades de YKL-40 descritas anteriormente, o dos o más de las actividades.

Fragmentos peptídicos

15 Un epítipo de la invención puede estar representado por de 3 a 6 restos de aminoácido de la SEQ ID NO: 1, estando ubicados dichos restos de aminoácido preferiblemente en las zonas de YKL-40 que comprenden los restos de aminoácido 83-90, 96-105, 137-150, 210-220, 304-314 y/o 318-329 según la secuencia de SEQ ID NO: 1, siendo los restos de aminoácido preferidos G, A, W, S, R, T y/o K. El epítipo también puede estar representado por una secuencia de aminoácidos contiguos derivada de la secuencia de SEQ ID NO: 1, tal como una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 2-7 o un fragmento de la misma.

Por tanto, un aspecto de la invención se refiere al/a los epítipo(s) que comprende(n) o consiste(n) en al menos una de las secuencias identificadas a continuación:

20 LKNRNPNL (SEQ ID NO: 2)

VGGWN FGSQR (SEQ ID NO: 3)

LAWLYPGRRDKQHF (SEQ ID NO: 4)

GAWRGTTGHHS (SEQ ID NO: 5)

RGATVHRTLGG (SEQ ID NO: 6).

25 YATKGNQWVG (SEQ ID NO: 7),

o un fragmento de las mismas, o una variante de las mismas.

30 Las secuencias anteriores según la invención son fragmentos inmunogénicos de YKL-40 humana, y un epítipo que comprende o consiste en al menos una de estas secuencias se reconoce por un anticuerpo funcional de la invención anterior. Por tanto, en un aspecto los fragmentos peptídicos identificados anteriormente pueden usarse para generar un anticuerpo funcional de la invención.

35 En otro aspecto de la invención, los fragmentos peptídicos pueden usarse como ligandos alternativos del receptor de YKL-40 que pueden competir por los sitios de unión en el receptor con la proteína YKL-40. La unión competitiva de los fragmentos peptídicos al receptor de YKL-40 puede atenuar la función de YKL-40 ejecutada a través de la unión y activación del receptor. Por tanto, los fragmentos peptídicos pueden usarse como compuestos para la inhibición de las funciones de la proteína YKL-40 ejecutadas a través de la unión al receptor. Preferiblemente, los fragmentos peptídicos van a usarse para inhibir la función de YKL-40 asociada con los procesos de

- i) estimulación del crecimiento celular,
- ii) estimulación de la supervivencia celular,
- iii) estimulación de la proliferación celular,
- 40 iv) estimulación de la diferenciación celular,
- v) estimulación de la remodelación de la matriz extracelular,
- vi) estimulación del desarrollo de la fibrosis hepática,
- vii) estimulación del desarrollo de la fibrosis de órganos,
- viii) estimulación del desarrollo de la fibrosis tisular,
- 45 ix) estimulación del desarrollo de la artritis reumatoide,

- x) estimulación del desarrollo de la metástasis,
- xi) estimulación de la angiogénesis, y/o
- xii) estimulación de la inflamación.

5 En la presente solicitud, se aplican el código de una letra convencional para restos de aminoácido, así como el código de tres letras convencional. Las abreviaturas de los aminoácidos son según las recomendaciones de la IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature Eur. J. Biochem, 1984, vol. 184, págs. 9-37. A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones, se usan o bien el código de tres letras o bien el código de una letra para aminoácidos naturales. Cuando no se ha especificado la forma L o D, debe entenderse que el aminoácido en cuestión tiene la forma L natural, véase Pure & Appl. Chem. vol. (56(5) págs. 595-624 (1984) o la forma D, de modo que los péptidos formados pueden estar constituidos por aminoácidos de forma L, forma D o una secuencia de formas L y formas D mezcladas.

10 Cuando no se especifica nada, debe entenderse que el aminoácido C-terminal de un péptido de la invención existe como el ácido carboxílico libre, esto puede especificarse como "-OH". Sin embargo, el aminoácido C-terminal de un compuesto de la invención puede ser el derivado amidado, que se indica como "-NH₂". Cuando no se establece nada más, el aminoácido N-terminal de un polipéptido comprende un grupo amino libre, esto puede especificarse también como "H-".

15 Cuando no se especifica nada más, el aminoácido puede seleccionarse de cualquier aminoácido, ya se produzca de manera natural o no, tal como alfa-aminoácidos, beta-aminoácidos y/o gamma-aminoácidos. Por consiguiente, el grupo comprende, pero no se limita a: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Aib, Nal, Sar, Orn, análogos de lisina, DAP, DAPA y 4Hyp.

20 Restos de aminoácido básicos están representados según la invención mediante los restos de aminoácidos Arg, Lys e His, los restos de aminoácido ácidos por los restos de aminoácidos Glu y Asp. Los restos de aminoácido básicos constituyen un grupo de restos de aminoácido cargados. El grupo de restos de aminoácido hidrófobos está representado por los restos de aminoácidos Leu, Ile, Val, Phe, Trp, Tyr y Met.

25 Según la invención, pueden realizarse modificaciones de los péptidos, tales como por ejemplo glicosilación y/o acetilación de los aminoácidos.

30 En una realización, puede entenderse que las variantes presentan secuencias de aminoácidos que difieren gradualmente de la secuencia predeterminada preferida, como el número y el alcance de las inserciones, deleciones y sustituciones incluyendo aumento de sustituciones conservativas. Esta diferencia se mide como una reducción en homología entre la secuencia predeterminada y la variante.

35 Según la invención, una secuencia peptídica puede tener la longitud de 5 o más restos de aminoácido. Se prefiere la longitud de 6-8 restos de aminoácido, ya que el epítipo/fragmento inmunogénico de la invención comprende preferiblemente 6-8 restos de aminoácido. Sin embargo, fragmentos inmunogénicos de las secuencias anteriores que consisten en de 3 a 7 restos de aminoácido tales como por ejemplo 4, 5 ó 6, también están dentro del alcance de la invención.

40 El límite superior para el número de restos de aminoácido en un fragmento peptídico de la invención puede variar. Por tanto, un fragmento peptídico que comprende un fragmento inmunogénico de la invención puede tener la longitud de hasta 250 restos de aminoácido. Por ejemplo, puede comprender desde 5 hasta 150 restos de aminoácido, tales como de 5 a 125, por ejemplo de 5 a 100, tal como de 5 a 80, por ejemplo de 5 a 65, de 5 a 50, de 5 a 30 o de 5 a 20.

45 Por tanto, la invención también muestra fragmentos peptídicos que comprenden o consisten en de 8 a 25 restos de aminoácido, tales como de 8 a 20, por ejemplo de 8 a 15. En otras realizaciones, la longitud de un fragmento peptídico puede ser de desde 10 hasta 25, tal como de 12 a 25, por ejemplo desde 14 hasta 25, o puede ser de desde 14 hasta 20 o desde 14 hasta 18 restos de aminoácido. En algunas realizaciones, un fragmento peptídico que comprende la secuencia inmunogénica de la invención (cualquiera de SEQ ID NO: 2-7) puede consistir en más de 25 restos de aminoácido, tales como desde 26 hasta 50 restos de aminoácido, por ejemplo 28-30, 31-35, 36-40, 41-45 o 46-49 restos de aminoácido.

Se entiende que todos los fragmentos peptídicos anteriores comprenden o consisten en al menos una de las secuencias seleccionadas de SEQ ID NO: 2-7, o un fragmento o variante de las mismas.

50 Un fragmento peptídico de la invención puede comprender o consistir en más de una secuencia inmunogénica de SEQ ID NO: 2-7 o fragmentos o variantes de las mismas. Los fragmentos peptídicos pueden formularse como monómeros. Esto significa que pueden representarse mediante copias únicas de secuencias peptídicas individuales que comprenden la secuencia inmunogénica. Un fragmento peptídico también puede comprender o consistir en más de una copia de la misma secuencia. Por tanto, la invención también se refiere a polímeros de secuencias peptídicas individuales de las anteriores. Un polímero de una secuencia peptídica puede representarse mediante una cadena

peptídica única, en la que una secuencia peptídica individual se repite dos o más veces en la cadena, o puede ser una molécula, en la que las copias de la secuencia peptídica individual están conectadas entre sí por medio de un grupo ligador. Ejemplos no limitados de tales polímeros pueden ser polímeros dendriméricos, en los que copias individuales de una secuencia peptídica están unidas a una molécula central, tal como lisina.

5 Un compuesto puede comprender o consistir en dos o más secuencias inmunogénicas diferentes de la invención.

Los fragmentos peptídicos que comprenden secuencias inmunogénicas de la invención pueden comprender o consistir en variantes de dichas secuencias.

“Variantes de secuencias peptídicas” significa que los péptidos pueden modificarse, por ejemplo, mediante sustitución de uno o más de los restos de aminoácido. Pueden usarse tanto L-aminoácidos como D-aminoácidos.

10 Otra modificación puede comprender derivados tales como ésteres, azúcares, etc. Ejemplos son ésteres metílicos y acetílicos. Se conoce bien en la técnica la polimerización tales como secuencias repetitivas o unión a diversos portadores, por ejemplo estructuras principales de lisina, tales como dendrímeros de lisina que portan 4 péptidos, 8 péptidos, 16 péptidos o 32 péptidos. Otros portadores pueden ser restos de proteína, tales como albúmina sérica bovina (BSA), o dendrímeros lipófilos, o portadores de tipo micela formados por derivados lipófilos, o conjugados de polímero de cadena de carbono estrellados (similares a una estrella), o conjunto de presentación de ligando (LPA) basado en derivados de dietilaminometano.

Variantes de los fragmentos peptídicos según la invención pueden comprender, dentro de la misma variante, o fragmentos de la misma, o entre diferentes variantes, o fragmentos de las mismas, al menos una sustitución, tal como una pluralidad de sustituciones introducidas independientemente entre sí. Por tanto, variantes del complejo o fragmentos del mismo pueden comprender sustituciones conservativas independientemente entre sí, en las que al menos una glicina (Gly) de dicha variante, o fragmentos de la misma, se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Ala, Val, Leu, e Ile, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, en las que al menos una alanina (Ala) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas, se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Gly, Val, Leu, e Ile, e independientemente de los mismos, variantes o fragmentos de las mismas, en las que al menos una valina (Val) de dicha variante, o fragmentos de la misma, se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Gly, Ala, Leu, e Ile, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, en las que al menos una leucina (Leu) de dicha variante, o fragmentos de la misma, se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Gly, Ala, Val, e Ile, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, en las que al menos una isoleucina (Ile) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas, se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Gly, Ala, Val y Leu, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, en las que al menos un ácido aspártico (Asp) de dicha variante, o fragmentos de la misma, se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Glu, Asn, y Gln, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, en las que al menos una asparagina (Asn) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas, se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Asp, Glu, y Gln, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, en las que al menos una glutamina (Gln) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas, se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Asp, Glu, y Asn, y en los que al menos una fenilalanina (Phe) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas, se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Tyr, Trp, His, Pro, y preferiblemente seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Tyr y Trp, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, en las que al menos una tirosina (Tyr) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas, se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Phe, Trp, His, Pro, preferiblemente un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Phe y Trp, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, en las que al menos una arginina (Arg) de dicho fragmento se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Lys e His, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, en las que al menos una lisina (Lys) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas, se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Arg e His, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, y en las que al menos una prolina (Pro) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas, se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Phe, Tyr, Trp, e His, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, en las que al menos una cisteína (Cys) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas, se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, y Tyr.

55 Por tanto, se deduce de lo anterior que el mismo equivalente funcional de un fragmento peptídico, o fragmento de dicho equivalente funcional puede comprender más de una sustitución de aminoácidos conservativa de más de un grupo de aminoácidos conservativos tal como se definió anteriormente en el presente documento. La expresión “sustitución de aminoácidos conservativa” se usa de manera sinónima en el presente documento con la expresión “sustitución de aminoácidos homólogos”. Los grupos de aminoácidos conservativos son los siguientes:

60 P, A, G, S, T (neutros, débilmente hidrófobos)

Q, N, E, D, B, Z (hidrófilos, amina ácida)

H, K, R (hidrófilos, básicos)

L, I, V, M, F, Y, W (hidrófobos, aromáticos)

C (que forma reticulaciones)

- 5 Pueden introducirse sustituciones conservativas en cualquier posición de un péptido predeterminado preferido de la invención o fragmento del mismo. Sin embargo, también puede ser deseable introducir sustituciones no conservativas, particularmente, pero sin limitarse a, una sustitución no conservativa en una cualquiera o más posiciones.

- 10 Una sustitución no conservativa que conduzca a la formación de un fragmento funcionalmente equivalente del péptido de la invención diferiría por ejemplo sustancialmente en cuanto a la polaridad, por ejemplo un residuo con una cadena lateral no polar (Ala, Leu, Pro, Trp, Val, Ile, Leu, Phe o Met) sustituido por un residuo con una cadena lateral polar tal como Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, o Gln o un aminoácido cargado tal como Asp, Glu, Arg, o Lys, o sustituir un residuo polar o cargado por uno no polar; y/o ii) diferiría sustancialmente en cuanto a su efecto sobre la orientación de la estructura principal peptídica tal como sustitución de Pro o Gly por otro residuo; y/o iii) diferiría sustancialmente en cuanto a la carga eléctrica, por ejemplo sustitución de un residuo cargado negativamente tal como Glu o Asp por un residuo cargado positivamente tal como Lys, His o Arg (y viceversa); y/o iv) diferiría sustancialmente en cuanto al volumen estérico, por ejemplo sustitución de un residuo voluminoso tal como His, Trp, Phe o Tyr por uno que tiene una cadena lateral menor, por ejemplo Ala, Gly o Ser (y viceversa).

- 20 La sustitución de aminoácidos puede realizarse en una realización basándose en sus valores de hidrofobicidad e hidrofiliidad y la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, incluyendo carga, tamaño y similares. Sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo, que tienen en consideración diversas de las características anteriores, las conocen bien los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

La función de YKL-40 que está asociada con los procesos de

- 25 i) estimulación del crecimiento celular, y/o
 ii) estimulación de la proliferación celular, y/o
 iii) estimulación de la supervivencia celular, y/o
 iv) estimulación de la diferenciación celular, y/o
 v) estimulación del desarrollo de metástasis, y/o
 30 vi) estimulación de la remodelación de la matriz extracelular, y/o
 vii) estimulación del desarrollo de fibrosis hepática, y/o
 viii) estimulación del desarrollo de fibrosis de órganos, y/o
 ix) estimulación del desarrollo de fibrosis tisular y/o
 x) estimulación del desarrollo de artritis reumatoide, y/o
 35 xi) estimulación de la angiogénesis, y/o
 xii) estimulación de la inflamación

puede seleccionarse de las siguientes actividades biológicas de YKL-40

- i) unión de quitina, y/o
 ii) unión de heparina, y/o
 40 iii) unión de sulfato de heparina y/o
 iv) unión de hialuronano, y/o
 v) unión de oligosacáridos largos y/o cortos, y/o
 vi) servir como factor de crecimiento celular, y/o

- vii) servir como factor de diferenciación celular, y/o
- viii) servir como quimioatrayente para células, y/o
- ix) interferir con la síntesis de hialuronano, y/o
- x) interferir con la remodelación de la matriz extracelular y/o
- 5 xi) estimular rutas de transducción de señales asociadas con supervivencia celular, y/o
- xii) estimular la angiogénesis, y/o
- xiii) interferir con la inflamación, y/o
- xiv) estimular la fibrogénesis.

10 Estas funciones biológicas de YKL-40 se ejecutan según la invención con la participación de las zonas estructurales de la proteína, que comprenden o consisten en al menos una de las siguientes secuencias

LKNRNPNL (SEQ ID NO: 2)

VGGWN FGSQR (SEQ ID NO: 3)

LAWLYPGRRDQHF (SEQ ID NO: 4)

GAWRGTTGHHS (SEQ ID NO: 5)

15 RGATVHRTLGG (SEQ ID NO: 6).

YATKGNQWVG (SEQ ID NO: 7)

20 Según la invención, todas las SEQ ID NO: 2-7 o al menos una de ellas están implicadas en la formación de un sitio de unión a receptor en YKL-40, participando dicho sitio en la ejecución de al menos una de las actividades biológicas identificadas anteriormente de YKL-40. Por tanto, la invención considera que la presencia de cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2-7 en una secuencia peptídica más larga es esencial para que dicha secuencia peptídica más larga posea la capacidad de (i) unirse de manera competitiva al receptor de YKL-40, y/o (ii) unirse de manera competitiva al anticuerpo funcionalmente activo de la invención. Por tanto, una secuencia que incluye al menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 2-7 se considera por la invención como un modulador de la actividad biológica de YKL-40 humana *in vivo* e *in vitro*. Por tanto, cuando tal secuencia compite con YKL-40 por la unión al receptor, la secuencia puede atenuar de ese modo la actividad de YKL-40, tal como regular por disminución la estimulación de la proliferación celular, diferenciación y/o supervivencia celular inducida por YKL-40, o cuando compite por la unión al anticuerpo, la secuencia puede atenuar la actividad de inhibición del anticuerpo y de ese modo regular por incremento la estimulación de la proliferación celular y/o supervivencia celular dependiente de YKL-40. Por consiguiente, se considera que una secuencia peptídica de 8-200 aminoácidos de longitud que comprende una secuencia seleccionada para SEQ ID NO: 2-7, o un fragmento de la misma, o una variante de la misma, es un homólogo funcional de YKL-40 humana, u homólogo funcional de cualquiera de las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 2-7.

Producción de secuencias peptídicas individuales

35 Las secuencias peptídicas de la presente invención pueden prepararse mediante cualquier método sintético convencional, tecnología de ADN recombinante, escisión enzimática de proteínas de longitud completa a partir de las que se derivan las secuencias peptídicas, o una combinación de dichos métodos.

Preparación recombinante

Por tanto, en una realización, los péptidos de la invención se producen mediante el uso de tecnologías de ADN recombinante.

40 La secuencia de ADN que codifica para un péptido o la correspondiente proteína de longitud completa a partir de la que se origina el péptido puede prepararse de manera sintética mediante métodos convencionales establecidos, por ejemplo el método de fosfoamidina descrito por Beaucage y Caruthers, 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, 1984, EMBO J. 3:801-805. Según el método de fosfoamidina, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se hibridan, se ligan y se clonan en vectores adecuados.

45 La secuencia de ADN que codifica para un péptido también puede prepararse mediante fragmentación de las secuencias de ADN que codifican para la correspondiente proteína de longitud completa de origen peptídico, usando ADNasa I según un protocolo convencional (Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A Laboratory manual. 2ª ed., CSHL

Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). La presente invención se refiere a proteínas de longitud completa seleccionadas de los grupos de proteínas identificados anteriormente. El ADN que codifica para las proteínas de longitud completa de la invención puede fragmentarse alternativamente usando endonucleasas de restricción específicas. Los fragmentos de ADN se purifican adicionalmente usando procedimientos convencionales descritos en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A Laboratory manual. 2ª ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

La secuencia de ADN que codifica para una proteína de longitud completa también puede ser de origen genómico o de ADNc, por ejemplo obtenida preparando una biblioteca genómica o de ADNc y examinándola para detectar secuencias de ADN que codifican para toda o parte de la proteína de longitud completa mediante hibridación usando sondas oligonucleotídicas sintéticas según técnicas convencionales (véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, 1989). La secuencia de ADN también puede prepararse mediante reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo tal como se describe en el documento US 4.683.202 o Saiki *et al.*, 1988, Science 239:487-491.

Entonces se inserta la secuencia de ADN en un vector de expresión recombinante, que puede ser cualquier vector, que puede someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante. La elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en la que va a introducirse. Por tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el/los cromosoma(s) en el/los que se ha integrado.

En el vector, la secuencia de ADN que codifica para un péptido o una proteína de longitud completa debe estar operativamente conectada con una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede derivarse de genes que codifican para proteínas o bien homólogas o bien heterólogas para la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN codificante en células de mamífero son el promotor de SV 40 (Subramani *et al.*, 1981, Mol. Cell Biol. 1:854-864), el promotor de MT-1 (gen de metalotienina) (Palmiter *et al.*, 1983, Science 222: 809-814) o el promotor tardío principal de adenovirus 2. Un promotor adecuado para su uso en células de insecto es el promotor de polihedrina (Vasuvedan *et al.*, 1992, FEBS Lett. 311:7-11). Promotores adecuados para su uso en células huésped de levadura incluyen promotores de genes glicolíticos de levadura (Hitzeman *et al.*, 1980, J. Biol. Chem. 255:12073-12080; Alber y Kawasaki, 1982, J. Mol. Appl. Gen. 1: 419-434) o genes de alcohol deshidrogenasa (Young *et al.*, 1982, en Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, Hollaender *et al.*, eds., Plenum Press, Nueva York), o los promotores TPI1 (US 4.599.311) o ADH2-4c (Russell *et al.*, 1983, Nature 304:652-654). Promotores adecuados para su uso en células huésped de hongos filamentosos son, por ejemplo, el promotor ADH3 (McKnight *et al.*, 1985, EMBO J. 4:2093-2099) o el promotor tpiA.

La secuencia de ADN codificante también puede estar operativamente conectada con un terminador adecuado, tal como el terminador de la hormona del crecimiento humana (Palmiter *et al.*, ya citada) o (para huéspedes fúngicos) los promotores TPI1 (Alber y Kawasaki, ya citada) o ADH3 (McKnight *et al.*, ya citada). El vector puede comprender adicionalmente elementos tales como señales de poliadenilación (por ejemplo de SV 40 o la región E1b de adenovirus 5), secuencias potenciadoras de la transcripción (por ejemplo el potenciador de SV 40) y secuencias potenciadoras de la traducción (por ejemplo las que codifican para ARN de VA de adenovirus).

El vector de expresión recombinante puede comprender además una secuencia de ADN que permite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Un ejemplo de una secuencia de este tipo (cuando la célula huésped es una célula de mamífero) es el origen de replicación de SV 40. El vector también puede comprender un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped, tal como el gen que codifica para dihidrofolato reductasa (DHFR) o uno que confiere resistencia a un fármaco, por ejemplo neomicina, hidromicina o metotrexato.

Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican para los péptidos o las proteínas de longitud completa, el promotor y el terminador, respectivamente, y para insertarlas en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, los conocen bien los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, ya citada).

Para obtener péptidos recombinantes de la invención, las secuencias de ADN codificante pueden fusionarse de manera útil con una segunda secuencia que codifica para péptidos y una secuencia que codifica para un sitio de escisión por proteasas, dando un constructo de ADN que codifica para la proteína de fusión, en el que la secuencia que codifica para el sitio de escisión por proteasas se coloca entre el fragmento HBP y un segundo ADN que codifica para péptidos, se inserta en un vector de expresión recombinante y se expresa en células huésped recombinantes. En una realización, dicho segundo péptido se selecciona de, pero no se limita al grupo que comprende glutatión-S-reductasa, timosina de ternero, tiorredoxina bacteriana o variantes sintéticas o naturales de ubiquitina humana, o péptidos de las mismas. En otra realización, una secuencia peptídica que comprende un sitio de escisión por proteasas puede ser el sitio de escisión de factor Xa, con la secuencia de aminoácidos *IEGR*, de enterocinasa, con la secuencia de aminoácidos *DDDDK*, de trombina, con la secuencia de aminoácidos *LVPR/GS*, o de

Acharombacter lyticus, con la secuencia de aminoácidos *XKX*.

La célula huésped en la que se introduce el vector de expresión puede ser cualquier célula que pueda expresar los péptidos o las proteínas de longitud completa, y es preferiblemente una célula eucariota, tal como células de invertebrados (insectos) o células de vertebrados, por ejemplo ovocitos de *Xenopus laevis* o células de mamífero, en particular células de insecto y de mamífero. Ejemplos de líneas celulares de mamífero adecuadas son las líneas celulares HEK293 (ATCC CRL-1573), COS (ATCC CRL-1650), BHK (ATCC CRL-1632, ATCC CCL-10) o CHO (ATCC CCL-61). Se describen métodos de transfección de células de mamífero y de expresión de secuencias de ADN introducidas en las células en, por ejemplo, Kaufman y Sharp, J. Mol. Biol. 159, 1982, pp. 601-621; Southern y Berg, 1982, J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341; Loyter *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 422-426; Wigler *et al.*, 1978, Cell 14:725; Corsaro y Pearson, 1981, en Somatic Cell Genetics 7, p. 603; Graham y van der Eb, 1973, Virol. 52: 456; y Neumann *et al.*, 1982, EMBO J. 1:841-845.

Alternativamente, pueden usarse células fúngicas (incluyendo células de levadura) como células huésped. Los ejemplos de células de levadura adecuadas incluyen células de *Saccharomyces spp.* o *Schizosaccharomyces spp.*, en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Ejemplos de otras células fúngicas son células de hongos filamentosos, por ejemplo *Aspergillus spp.* o *Neurospora spp.*, en particular cepas de *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. El uso de *Aspergillus spp.* para la expresión de proteínas se describe en, por ejemplo, el documento EP 238 023.

El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer crecer células de mamífero, tal como medio que contiene suero o libre de suero que contiene complementos apropiados, o un medio adecuado para hacer crecer células de insecto, de levadura o fúngicas. Están disponibles medios adecuados de proveedores comerciales o pueden prepararse según recetas publicadas (por ejemplo en catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo).

Los péptidos o las proteínas de longitud completa producidos de manera recombinante por la células pueden recuperarse entonces del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales incluyendo separar las células huésped del medio mediante centrifugación o filtración, precipitar los componentes proteicos del sobrenadante o el filtrado por medio de una purificación con sal, por ejemplo sulfato de amonio, mediante una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, HPLC, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similar.

Preparación sintética

Los métodos para la producción sintética de péptidos se conocen bien en la técnica. Pueden encontrarse descripciones detalladas así como consejos prácticos para producir péptidos sintéticos en Synthetic Peptides: A User's Guide (Advances in Molecular Biology), Grant G. A. ed., Oxford University Press, 2002, o en: Pharmaceutical Formulation: Development of Peptides and Proteins, Frokjaer y Hovgaard eds., Taylor y Francis, 1999.

Por ejemplo, pueden sintetizarse péptidos usando química de Fmoc y con cisteína protegidas con Acm. Tras la purificación mediante HPLC en fase inversa, los péptidos pueden procesarse adicionalmente para obtener por ejemplo isoformas cíclicas o modificadas en los extremos C- o N-terminal. Los métodos para la ciclización y modificación terminal se conocen bien en la técnica y se describen en detalle en los manuales citados anteriormente.

En una realización preferida, las secuencias peptídicas de la invención se producen de manera sintética, en particular, mediante el método de síntesis de péptidos asistida por secuencia (SAPS).

Mediante SAPS, pueden sintetizarse péptidos o bien de manera discontinua en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración o bien en la versión de flujo continuo del método de fase sólida de poliamida (Dryland, A. y Sheppard, R.C., (1986) J.Chem. Soc. Perkin Trans. I, 125 - 137) en un sintetizador de péptidos completamente automatizado usando 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) o terc-butiloxycarbonilo (Boc) como grupo protector de N-a-amino y grupos de protección comunes adecuados para la funcionalidad de la cadena lateral. Cuando se sintetizan, pueden formularse entonces secuencias peptídicas individuales como multímeros usando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo pueden obtenerse dímeros de las secuencias mediante el método de LPA descrito en el documento WO 00/18791, se describen polímeros dendrímicos mediante la síntesis MAP en el documento PCT/US90/02039.

Composición farmacéutica

En el presente contexto, la expresión "composición farmacéutica" se usa de manera sinónima con el término "medicamento".

En algunas realizaciones, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que puede unirse al epitopo tal como se definió anteriormente, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo. Preferiblemente, una composición farmacéutica comprende los anticuerpos monoclonales 115F9, 116F9 y/o 201 F9, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante de los mismos, lo más preferiblemente el

anticuerpo monoclonal 201 F9, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo. Lo más preferiblemente, una composición farmacéutica de la invención comprende o esencialmente comprende una(s) forma(s) humanizada(s) de los anticuerpos 115F9, 116F9 y/o 201 F9.

5 En otras realizaciones la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un fragmento inmunogénico de YKL-40, comprendiendo dicho fragmento al menos una de las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 2-7.

10 En una realización, una composición farmacéutica comprende la secuencia peptídica identificada como SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma, o una variante de la misma. En otra realización, la composición comprende la secuencia peptídica identificada como SEQ ID NO: 3, o un fragmento de la misma, o una variante de la misma. Todavía en otra realización, la composición comprende la secuencia peptídica identificada como SEQ ID NO: 4, o un fragmento de la misma, o una variante de la misma. Aún en otra realización, la composición comprende la secuencia peptídica identificada como SEQ ID NO: 5, o un fragmento de la misma, o una variante de la misma. Aún todavía en otra realización, la composición comprende la secuencia peptídica identificada como SEQ ID NO: 6, o un fragmento de la misma, o una variante de la misma, o la secuencia peptídica identificada como SEQ ID NO: 6, o un fragmento de la misma, o una variante de la misma. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica puede comprender cualquier combinación de las secuencias SEQ ID NO: 2-7.

En una composición, las secuencias peptídicas pueden formularse como fragmentos peptídicos individuales aislados o multímeros o dímeros de los mismos tal como se trató anteriormente.

20 La composición farmacéutica descrita anteriormente puede usarse por ejemplo para promotor la muerte de células cancerosas *in vitro* o *in vivo*.

La composición que se administra a un sujeto *in vivo* o que va a usarse *in vitro* contiene una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos descritos anteriormente en combinación con aditivos farmacéuticamente aceptables. Tal medicamento puede formularse adecuadamente para administración oral, percutánea, intramuscular, intravenosa, intracraneal, intratecal, intracerebroventricular, intranasal o pulmonar.

25 Las estrategias en el desarrollo de formulaciones de medicamentos y composiciones basadas en los compuestos de la presente invención corresponden generalmente a estrategias de formulación para cualquier otro producto farmacológico a base de proteínas. Se abordan posibles problemas y la orientación requerida para superar estos problemas en varios libros de texto, por ejemplo "Therapeutic Peptides and Protein Formulation. Processing and Delivery Systems", Ed. A.K. Banga, Technomic Publishing AG, Basel, 1995.

30 Se preparan habitualmente composiciones inyectables como o bien disoluciones o bien suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse. El principio activo se mezcla a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la preparación puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH o que potencian la eficacia o el transporte de la preparación.

Pueden prepararse formulaciones de los compuestos de la invención mediante técnicas conocidas por el experto en la técnica. Las formulaciones pueden contener vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo microesferas, liposomas, microcápsulas, nanopartículas o similares.

40 La preparación puede administrarse adecuadamente mediante inyección, opcionalmente en el sitio en el que el principio activo va a ejercer su efecto. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios, formulaciones nasales, pulmonares y, en algunos casos, orales. Para los supositorios, los vehículos y aglutinantes tradicionales incluyen polialquilenglicoles o triglicéridos. Tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el/los principio(s) activo(s) en el intervalo de desde el 0,5% hasta el 10%, preferiblemente el 1-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y generalmente contienen el 10-95% del/de los principio(s) activo(s), preferiblemente el 25-70%.

50 Otras formulaciones son las adecuadas para administración nasal y pulmonar, por ejemplo inhaladores y aerosoles.

El compuesto activo puede formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del compuesto peptídico) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico y fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido mandélico y similares. Las sales formadas con el grupo carboxilo libre también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y

similares.

Las preparaciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en tal cantidad que será terapéuticamente eficaz. La cantidad que va a administrarse depende del sujeto que va a tratarse, incluyendo, por ejemplo, el peso y la edad del sujeto, la enfermedad que va a tratarse y el estadio de la enfermedad.

5 Intervalos de dosificación adecuados son, por kilo de peso corporal, normalmente del orden de varios cientos de μg de principio activo por administración con un intervalo preferido de desde aproximadamente 0,1 μg hasta 5000 μg por kilo de peso corporal. Usando formas monoméricas de los compuestos, las dosificaciones adecuadas se encuentran a menudo en el intervalo de desde 0,1 μg hasta 5000 μg por kilo de peso corporal, tal como en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 μg hasta 3000 μg por kilo de peso corporal, y especialmente en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 μg hasta 1000 μg por kilo de peso corporal. Usando formas multiméricas de los compuestos, las dosificaciones adecuadas se encuentran a menudo en el intervalo de desde 0,1 μg hasta 1000 μg por kilo de peso corporal, tal como en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 μg hasta 750 μg por kilo de peso corporal, y especialmente en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 μg hasta 500 μg por kilo de peso corporal tal como en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 μg hasta 250 μg por kilo de peso corporal. En particular cuando se administran por vía nasal se usan dosificaciones menores que cuando se administran por otras vías. La administración puede realizarse una vez o puede ir seguida por administraciones posteriores. La dosificación también dependerá de la vía de administración y variará con la edad y el peso del sujeto que va a tratarse. Una dosificación preferida de formas multiméricas estaría en el intervalo de 1 mg a 70 mg por 70 kg de peso corporal.

Para algunas indicaciones se prefiere una aplicación localizada o sustancialmente localizada.

20 Algunos de los compuestos de la presente invención son suficientemente activos, pero para algunos de los otros, el efecto se potenciará si la preparación comprende además aditivos y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Tales aditivos y vehículos se conocerán en la técnica. En algunos casos, será ventajoso incluir un compuesto que promueve la administración de la sustancia activa a su diana.

25 En muchos casos, será necesario administrar la formulación múltiples veces. La administración puede ser una infusión continua, tal como administración o infusión intraventricular en más dosis tal como más veces al día, diariamente, más veces a la semana, semanalmente, etc. Se prefiere que la administración del medicamento se inicie antes o poco después de que el individuo se haya visto sometido al/a los factor(es) que puede(n) conducir a la muerte celular. Preferiblemente el medicamento se administra en el plazo de 8 horas desde la aparición del factor, tal como en el plazo de 5 horas desde la aparición del factor. Muchos de los compuestos presentan un efecto a largo plazo por lo que la administración de los compuestos puede realizarse con intervalos largos, tales como 1 semana o 2 semanas.

30 En relación con el uso en guías nerviosas, la administración puede ser continua o en pequeñas porciones basándose en la liberación controlada del/de los compuesto(s) activo(s). Además, pueden usarse precursores para controlar la velocidad de liberación y/o el sitio de liberación. Otras clases de implantes y también administración oral pueden basarse de manera similar en liberación controlada y/o el uso de precursores.

La presente invención también se refiere al tratamiento de individuos que necesitan inducir muerte celular, inhibir el desarrollo de crecimiento celular de fibrosis hepática o artritis reumatoide. El tratamiento implica administrar una composición farmacéutica de la invención que comprende una cantidad eficaz de uno o más compuestos tal como se definió anteriormente.

40 **Tratamiento**

Tal como se trató anteriormente, los anticuerpos y fragmentos peptídicos descritos en el presente documento pueden usarse para modular, tal como inhibir o estimular, al menos una de las actividades biológicas de YKL-40 indicadas a continuación:

- i) unión de quitina,
- 45 ii) unión de heparina,
- iii) unión de sulfato de heparán,
- iv) unión de hialuronano,
- v) unión de oligosacáridos largos y/o cortos,
- vi) servir como factor de crecimiento celular,
- 50 vii) servir como factor de diferenciación,
- viii) servir como quimioatrayente para células,

- ix) interferir con la síntesis de hialuronano,
- x) estimular rutas de transducción de señales asociadas con supervivencia celular,
- xi) estimular la angiogénesis,
- xii) estimular la fibrogénesis,
- 5 xiii) interferir con la remodelación de la matriz extracelular,
- xiv) interferir con la inflamación, y/o
- xv) estimular el desarrollo de la metástasis.

10 Las actividades anteriores de YKL-40 humana se han asociado con la capacidad de la proteína para estimular el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celulares, la remodelación de la matriz extracelular, la fibrosis y la angiogénesis. Por tanto, también pueden usarse anticuerpos y fragmentos peptídicos de la invención para inhibir el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celulares, el desarrollo de metástasis y/o la remodelación de la matriz extracelular, la fibrosis, la angiogénesis y la inflamación. Existen varias enfermedades y estados patológicos en los que el tratamiento de un individuo que lo necesita que comprende usar

15 tales anticuerpos y/o fragmentos peptídicos, o una composición farmacéutica que comprende los mismos puede conducir a un curado satisfactorio. El término "anticuerpo" en el presente contexto designa tanto anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y proteínas recombinantes de los mismos.

Por tanto, los anticuerpos y/o fragmentos peptídicos, o una composición farmacéutica que comprende los mismos, pueden usarse satisfactoriamente para el tratamiento de cualquier cáncer primario seleccionado de carcinoma de mama, colorrectal, de páncreas, de estómago, hepatocelular, otros carcinomas gastrointestinales, de pulmón, de pulmón de células pequeñas, de ovarios, de útero, de cuello uterino, de testículos, de próstata, de vejiga, renal, de tiroides y de cabeza/cuello, melanoma maligno y otros cánceres cutáneos, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, glioblastoma u otros tumores cerebrales, tumores de células germinales y tumores malignos hematopoyéticos.

20

O, el anticuerpo y/o fragmentos peptídicos, o una composición farmacéutica que comprende los mismos puede usarse para el tratamiento de cualquier cáncer metastásico seleccionado de carcinoma de mama, colorrectal, de páncreas, de estómago, hepatocelular, otros carcinomas gastrointestinales, de pulmón, de pulmón de células pequeñas, de ovarios, de útero, de cuello uterino, de testículos, de próstata, de vejiga, renal, de tiroides y de cabeza/cuello, melanoma maligno y otros cánceres cutáneos, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, glioblastoma u otros tumores cerebrales, tumores de células germinales y tumores malignos hematopoyéticos.

25

Aún en otra realización, el anticuerpo y/o fragmentos peptídicos, o una composición farmacéutica que comprende los mismos puede usarse para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria seleccionada de, por ejemplo, artritis reumatoide, otras enfermedades inflamatorias de las articulaciones, infección bacteriana, enfermedad inflamatoria del intestino activa o fibrosis hepática (por ejemplo provocada por virus de la hepatitis B o C o alcoholismo).

30

Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo, y/o fragmentos peptídicos, o una composición farmacéutica que comprende los mismos, puede usarse también para la

35

- inhibición de la proliferación de cualquier célula no tumoral;
- la inhibición de la angiogénesis;
- la inhibición de la remodelación de la matriz extracelular;
- la inhibición de la fibrosis tisular,

40 en cualquier estado patológico, tal como por ejemplo artritis reumatoide, arteritis de células gigantes, espondilitis anquilosante, tuberculosis, sarcoidosis, esclerodermia, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, fibrosis hepática alcohólica, hepatitis C en los que dicha inhibición puede ser ventajosa para el curado.

Aún en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad o estado tal como se trató anteriormente administrando el anticuerpo y/o fragmentos peptídicos de la invención, o una composición farmacéutica que comprende los mismos.

45

Adicionalmente, la invención se refiere al uso de anticuerpos y/o fragmentos peptídicos de la invención, o una composición farmacéutica que comprende los mismos en ensayos y métodos *in vitro*, por ejemplo en ensayos para seleccionar nuevos compuestos anticancerígenos.

Ejemplos

1. Inhibición de la supervivencia y el crecimiento de células cancerosas mediante anticuerpos monoclonales anti-YKL-40 humana *in vitro*

5 Se mantuvieron de manera rutinaria células de glioblastoma maligno humano U87, osteosarcomas humanos MG63 y U2OS y melanoma maligno humano SK-MEL28 en cultivo en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco), complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 10% y antibióticos (penicilina y estreptomina). Todas las líneas celulares se obtuvieron de la ATTC.

Anticuerpos anti-YKL-40 humana (Ac):

116F9 (monoclonal de ratón; la dilución de Ac máxima 1:100 es igual a una concentración de Ac de 0,06 mg/ml)

115F9 (monoclonal de ratón; la dilución de Ac máxima 1:50 es igual a una concentración de Ac de 0,03 mg/ml)

10 201F9 (monoclonal de ratón; la dilución de Ac máxima 1:250 es igual a una concentración de Ac de 0,03 mg/ml)

R668 (policlonal de conejo; la dilución de Ac máxima 1:50 es igual a una concentración de Ac de 0,0075 mg/ml)

Procedimiento:

15 Se sembraron las células en placas de 96 pocillos (12 pocillos x 8 filas) con una densidad de 5000 células/pocillo en 200 μ l de medio. Se dejó que las células se unieran y crecieran durante la noche. Al día siguiente se desechó el medio de crecimiento y se enjuagaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Posteriormente, se trataron las células con 200 μ l de medio nuevo que contenía diferentes diluciones de los anticuerpos tal como se muestra a continuación:

	Placa 1+2	Placa 3+4	Placa 5+6	Placa 7+8
	115F9	116F9	201F9	R667
Fila				
1 A:	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2 B:	1:50	Negativo	Negativo	1:50
3 C:	1:100	1:100	Negativo	1:100
4 D:	1:250	1:250	1:250	1:250
5 E:	1:500	1:500	1:500	1:500
6 F:	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000
7 G:	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500
8 H:	1:5000	1:5000	1:5000	1:5000

En cada placa, se incubaron los pocillos 1 a 6 de de cada fila en presencia de FCS al 10% en el medio, los pocillos 7 a 12 se incubaron en presencia de albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% sin FCS en el medio.

20 Se incubó una placa de cada tratamiento con anticuerpo en condiciones de normoxia, y otra placa en condiciones de hipoxia (0,1%) durante 72 horas antes del tratamiento con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma).

Ensayo de MTT:

25 Se realizó el ensayo de MTT (que permite distinguir entre células vivas y muertas en el cultivo) según Mossmann T. J Immunol Methods 65:55-63, 1983.

30 Se añadieron 40 μ l de MTT a cada pocillo (disolución madre de 2 mg/ml) y se incubaron las placas durante 1 hora a 37°C en un incubador normóxico. Después de eso, se desechó el medio y se añadieron 100 μ l de DMSO a cada pocillo. Se agitaron las placas durante 10 s y se leyeron los valores de DO (densidad óptica) a 570 nm (con la corrección del fondo en 690 nm). Los resultados se facilitan como un promedio de DO en 6 pocillos +/- desviación estándar.

Tal como puede observarse a partir de la figura 1, los anticuerpos monoclonales (AcM) 116F9 y 201F9 tienen un efecto represor sobre el crecimiento de células de glioblastoma U87 reflejado por una reducción del número de células en pocillos tratados (con antibiótico) en comparación con pocillos control (sin anticuerpo denominado

“Control” en la figura 1 y “Negativo” en la figura 2) tras 72 horas de tratamiento independientemente de la presencia de FCS en el medio de cultivo. El Ac monoclonal 115F9 y el Ac policlonal R667 (no mostrado) no inhibieron el crecimiento de células cancerosas sometidas a prueba. Se sometió adicionalmente a prueba el AcM 116F9 en cultivos de dos líneas celulares de osteosarcoma humano, MG63 y U2OS y una línea celular de melanoma humano, SK-MEL-28.

Los resultados mostrados en la figura 2 demuestran que el AcM 116F9 tiene un efecto represor del crecimiento en ambas células de osteosarcoma, pero no en células SK-MEL-28 de melanoma. Las dos líneas celulares de osteosarcoma sometidas a prueba se caracterizan por un alto nivel de expresión de YKL-40, mientras que la línea de células SK-MEL-28 tiene un nivel de expresión muy bajo, si es que hay alguno.

Estos resultados demuestran que los anticuerpos monoclonales contra YKL-40 (AcM 116F9 y 201F9) tienen el efecto represor del crecimiento en células cancerosas que expresan YKL-40. El efecto puede deberse a la inhibición del crecimiento y la supervivencia celulares o a la inducción de apoptosis, o deberse a ambos.

Ejemplo 2. Inhibición de crecimiento de células cancerosas por anticuerpos monoclonales anti-YKL-40 humana *in vivo*.

Se inyectaron células U87 de glioblastoma humano (4×10^6 células/tumor) por vía subcutánea en ratones desnudos. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 100 mm^3 , se dividieron los ratones en 3 grupos de diez ratones cada uno. Se trató el grupo A con AcM 201F9 40 mg/kg i.p. a partir del día de tratamiento 1 y dos veces a la semana después de eso. Se trató el grupo B con AcM 116F9 28 mg/kg i.p. a partir del día de tratamiento 1 y dos veces a la semana después de eso. El grupo C (control) recibió PBS (NaCl tamponado con fosfato) i.p. dos veces a la semana. Se midió diariamente el tamaño tumoral y se sacrificaron los ratones cuando el tamaño tumoral alcanzó el volumen de 1000 mm^3 . Se muestra el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de tumores individuales hasta 600 mm^3 en la figura 3 (curvas de Kaplan-Meier). Puede observarse que inyecciones dos veces a la semana de AcM 201F9 (40 mg/kg) reduce el crecimiento de tumores U87 en comparación con tumores en animales tratados con PBS (prueba de rangos logarítmicos $p < 0,05$). Este es el caso para dos periodos de tiempo de tratamiento diferentes, los días hasta que el tumor alcanza el volumen de 600 mm^3 y los días hasta el volumen de 900 mm^3 (no mostrado). La figura 3 muestra que el AcM 116F9 no tenía ningún efecto de inhibición significativo sobre el crecimiento de tumores U87 en comparación con el crecimiento de los tumores en ratones desnudos tratados con PBS. Sin embargo, los ratones tratados con 116F9 recibieron una dosis inferior del anticuerpo en comparación con ratones tratados con el anticuerpo 201F9, y podría especularse que 116F9 administrado a una dosis superior podría tener un efecto de inhibición sobre el crecimiento tumoral.

En otro experimento, se inyectaron células U87 de glioblastoma humano (8×10^6 células/tumor) por vía subcutánea en ratones desnudos. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 200 mm^3 , se dividieron los ratones en 4 grupos de diez ratones cada uno. Los grupos A y C recibieron 8 Gy de radiación ionizante (RI) en el día de tratamiento 1. Se trataron los grupos A y B con AcM 201F9 40 mg/kg i.p. a partir del día de tratamiento 1 y dos veces a la semana después de eso. El grupo D (control) recibió PBS (NaCl tamponado con fosfato) i.p. dos veces a la semana. Se midió el tamaño tumoral diariamente y se sacrificaron los ratones cuando el tamaño tumoral alcanzó el volumen de 1000 mm^3 . Se muestra el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de tumores hasta 600 mm^3 en la figura 4.

Los resultados mostrados en la figura 4 demuestran que la radiación ionizante (RI) también tiene un efecto reductor del crecimiento significativo sobre los tumores, que es comparable al efecto del anticuerpo AcM 201F9. El tratamiento simultáneo con AcM 201F9 y RI no conduce a un efecto sinérgico de AcM y RI. Los valores de P para la prueba de rangos logarítmicos se resumen en la tabla 1 a continuación:

	T600	T900
PBS v. AcM	P=0,0465	P=0,0472
PBS v. RI	P=0,021	P=0,0067
RI v. RI+AcM	P=0,877	P=0,8235

Los valores de p son pruebas de rangos logarítmicos.

RI - radiación ionizante

AcM - Ac monoclonal 201F9

T600 - periodo de tiempo hasta el volumen de crecimiento tumoral de 600 mm^3

T900 - periodo de tiempo hasta el volumen de crecimiento tumoral de 900 mm^3

Ejemplo 3. Mapeo de epítomos de YKL-40 para el AcM 201F9.

Se realizó el mapeo de epítomos analizando la unión del anticuerpo 201F9 a fragmentos peptídicos de YKL-40 humana (n.º de registro de Swissprot: P36222; SEQ ID NO: 1). Se sintetizó una biblioteca de péptidos de 381 fragmentos peptídicos solapantes (de 8-14 restos de aminoácido) de la secuencia de YKL-40 y se examinó para detectar la capacidad de unirse al Ac 201F9 Ab por Pepscan Systems BV (Países Bajos).

5 Varios grupos de los péptidos que cubrían las zonas de YKL-40 que comprenden los restos de aminoácido 81-105, 127-165, 203-223, 279-292, 300-316 y 318-335 demostraron una unión significativa. Basándose en estos datos y el análisis de zonas estructurales de YKL-40 que incluyen estos fragmentos peptídicos, se diseñó un nuevo grupo de péptidos, se sintetizó y se examinó para detectar la unión a anticuerpos. Los nuevos péptidos se diseñaron considerando que la posición de una secuencia peptídica en una estructura de bucle de la proteína YKL-40 era favorable.

10 Se identificaron seis péptidos que cubrían los restos 83-90 (SEQ ID NO: 2), 96-105 (SEQ ID NO: 3), 137-150 (SEQ ID NO: 4), 210-220 (SEQ ID NO: 5), 304-314 (SEQ ID NO: 6) y 318-329 (SEQ ID NO: 7) como posibles epítomos/determinantes antigénicos para el anticuerpo 201F9. La figura 5 demuestra la ubicación de los péptidos en la estructura de YKL-40. Se alinearon las secuencias de los fragmentos peptídicos y parecía que las secuencias de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 y 7 compartían homología. En la tabla 2 (a continuación) se alinean las secuencias y se muestra la homología de restos de aminoácido en negrita indicando los restos de aminoácido idénticos y subrayados en negrita los restos de aminoácido homólogos.

Tabla 2.

	GAWRGTTGHHS	(SEQ ID NO: 5)
20	YAT KGN QWVG Y	(SEQ ID NO: 7)
	GAWRGTTGHHS	(SEQ ID NO: 5)
	RGATVHRTL GQ	(SEQ ID NO: 6)
25	GAWRGIT GHHS	(SEQ ID NO: 5)
	LAWLYP GRRDKQHF	(SEQ ID NO: 4)
	GAWRGIT GHHS	(SEQ ID NO: 5)
	VGGWN FG S QR	(SEQ ID NO: 3)
30	GAWRGIT GHHS	(SEQ ID NO: 5)
	LKNR NPNL	(SEQ ID NO: 2)

35 A partir de la tabla parece que los restos G, A, W, R, T, P y S son lo más probablemente los restos que determinan las propiedades antigénicas de las secuencias, y es probable que la secuencia GAWRGTTGHHS (SEQ ID NO: 5) sea la secuencia que comprende el epítipo principal para el anticuerpo 201F9.

40 Se ha mostrado anteriormente que los restos de aminoácido ubicados dentro de las secuencias correspondientes a los restos 210-220 (SEQ ID NO: 5) y 137-150 (SEQ ID NO: 4) de YKL-40 están implicados en la unión a receptor/ligando de YKL-40 (véase por ejemplo Houston *et al.* (2003) J Biol Chem 278:30206-30212, y Fusetti *et al.* (2003) J Biol Chem 278:37753-37760). Los presentes datos demuestran que las secuencias también comprenden determinantes antigénicos para el anticuerpo 201F9. La ocupación de estos restos por el anticuerpo inhibe la actividad biológica de YKL-40 y por tanto conduce a la inhibición del crecimiento de células cancerosas.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> BIO-Y A/S
- 45 <120> Anticuerpo monoclonal frente a YKL-40
- <130> P866PC00

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 383

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Gly Val Lys Ala Ser Gln Thr Gly Phe Val Val Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Gln Cys Cys Ser Ala Tyr Lys Leu Val Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ser
 20 25 30

Gln Tyr Arg Glu Gly Asp Gly Ser Cys Phe Pro Asp Ala Leu Asp Arg
 35 40 45

Phe Leu Cys Thr His Ile Ile Tyr Ser Phe Ala Asn Ile Ser Asn Asp
 50 55 60

His Ile Asp Thr Trp Glu Trp Asn Asp Val Thr Leu Tyr Gly Met Leu
 65 70 75 80

Asn Thr Leu Lys Asn Arg Asn Pro Asn Leu Lys Thr Leu Leu Ser Val
 85 90 95

Gly Gly Trp Asn Phe Gly Ser Gln Arg Phe Ser Lys Ile Ala Ser Asn
 100 105 110

Thr Gln Ser Arg Arg Thr Phe Ile Lys Ser Val Pro Pro Phe Leu Arg
 115 120 125

Thr His Gly Phe Asp Gly Leu Asp Leu Ala Trp Leu Tyr Pro Gly Arg
 130 135 140

Arg Asp Lys Gln His Phe Thr Thr Leu Ile Lys Glu Met Lys Ala Glu
 145 150 155 160

Phe Ile Lys Glu Ala Gln Pro Gly Lys Lys Gln Leu Leu Leu Ser Ala
 165 170 175

Ala Leu Ser Ala Gly Lys Val Thr Ile Asp Ser Ser Tyr Asp Ile Ala
 1

			180						185							190
Lys	Ile	Ser	Gln	His	Leu	Asp	Phe	Ile	Ser	Ile	Met	Thr	Tyr	Asp	Phe	
		195					200					205				
His	Gly	Ala	Trp	Arg	Gly	Thr	Thr	Gly	His	His	Ser	Pro	Leu	Phe	Arg	
	210					215					220					
Gly	Gln	Glu	Asp	Ala	Ser	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Asn	Thr	Asp	Tyr	Ala	
225					230					235					240	
Val	Gly	Tyr	Met	Leu	Arg	Leu	Gly	Ala	Pro	Ala	Ser	Lys	Leu	Val	Met	
				245					250					255		
Gly	Ile	Pro	Thr	Phe	Gly	Arg	Ser	Phe	Thr	Leu	Ala	Ser	Ser	Glu	Thr	
			260					265					270			
Gly	Val	Gly	Ala	Pro	Ile	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Pro	Gly	Arg	Phe	Thr	
		275					280					285				
Lys	Glu	Ala	Gly	Thr	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Ile	Cys	Asp	Phe	Leu	Arg	
	290					295					300					
Gly	Ala	Thr	Val	His	Arg	Thr	Leu	Gly	Gln	Gln	Val	Pro	Tyr	Ala	Thr	
305					310					315					320	
Lys	Gly	Asn	Gln	Trp	Val	Gly	Tyr	Asp	Asp	Gln	Glu	Ser	Val	Lys	Ser	
				325					330					335		
Lys	Val	Gln	Tyr	Leu	Lys	Asp	Arg	Gln	Leu	Ala	Gly	Ala	Met	Val	Trp	
			340					345					350			
Ala	Leu	Asp	Leu	Asp	Asp	Phe	Gln	Gly	Ser	Phe	Cys	Gly	Gln	Asp	Leu	
		355					360					365				
Arg	Phe	Pro	Leu	Thr	Asn	Ala	Ile	Lys	Asp	Ala	Leu	Ala	Ala	Thr		
	370					375					380					

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> fragmento peptídico de YKL-40

<400> 2

Leu Lys Asn Arg Asn Pro Asn Leu
1 5

<210> 3

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> fragmento peptídico de YKL-40

<400> 3

10 Val Gly Gly Trp Asn Phe Gly Ser Gln Arg
1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> fragmento peptídico de YKL-40

<400> 4

Leu Ala Trp Leu Tyr Pro Gly Arg Arg Asp Lys Gln His Phe
1 5 10

<210> 5

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> fragmento peptídico de YKL-40

25 <400> 5

Gly Ala Trp Arg Gly Thr Thr Gly His His Ser
1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> fragmento peptídico de YKL-40

<400> 6

Arg Gly Ala Thr Val His Arg Thr Leu Gly Gln
1 5 10

<210> 7

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> fragmento peptídico de YKL-40

10 <400> 7

Tyr Ala Thr Lys Gly Asn Gln Trp Val Gly Tyr
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo, que es específico para YKL-40 humana (SEQ ID NO: 1), pudiendo dicho anticuerpo, fragmento de unión o proteína recombinante del mismo inhibir el crecimiento de una célula tras su unión a un epítipo en YKL-40, siendo la célula una célula cancerosa que expresa YKL-40.
2. Anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo, según la reivindicación 1, pudiendo dicho anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante reconocer específicamente y unirse a un epítipo que comprende los restos 210-220 de SEQ ID NO: 1.
3. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, siendo el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
4. Anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula es una célula cancerosa y la célula cancerosa es de cualquier cáncer primario o metastásico seleccionado de carcinoma de mama, colorrectal, de páncreas, de estómago, hepatocelular, otros carcinomas gastrointestinales, de pulmón, de pulmón de células pequeñas, de ovarios, de útero, de cuello uterino, de testículos, de próstata, de vejiga, renal, de tiroides y de cabeza/cuello, melanoma maligno, otros cánceres cutáneos, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, glioblastoma u otros tumores cerebrales, tumores de células germinales y tumores malignos hematopoyéticos.
5. Fragmento peptídico que consiste en la secuencia GAWRGTTGHHS (SEQ ID NO: 5).
6. Uso *in vitro* de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo según se definen dicho anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo en las reivindicaciones 1 a 4 para inhibir el crecimiento celular, la diferenciación y/o la supervivencia celular.
7. Medicamento que comprende el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la prevención de la progresión y/o el tratamiento de un estado patológico seleccionado del grupo que consiste en cáncer, enfermedad inflamatoria y fibrosis.
8. Medicamento según la reivindicación 7, en el que el estado patológico se selecciona de un cáncer sólido, tumor maligno hematológico y enfermedad inflamatoria.
9. Medicamento según la reivindicación 7, en el que el cáncer es un cáncer primario o cáncer metastásico seleccionado de cualquier cáncer primario o cáncer metastásico seleccionado de carcinoma de mama, colorrectal, de páncreas, de estómago, hepatocelular, otros carcinomas gastrointestinales, de pulmón, de pulmón de células pequeñas, de ovarios, de útero, de cuello uterino, de testículos, de próstata, de vejiga, renal, de tiroides y de cabeza/cuello, melanoma maligno, otros cánceres cutáneos, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, glioblastoma u otros tumores cerebrales, tumores de células germinales y tumores malignos hematopoyéticos.
10. Medicamento según la reivindicación 7, en el que la enfermedad inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, infección bacteriana, enfermedad inflamatoria del intestino activa, enfermedades inflamatorias, fibrosis hepática, fibrosis de órganos, fibrosis tisular y fibrosis cutánea.
11. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

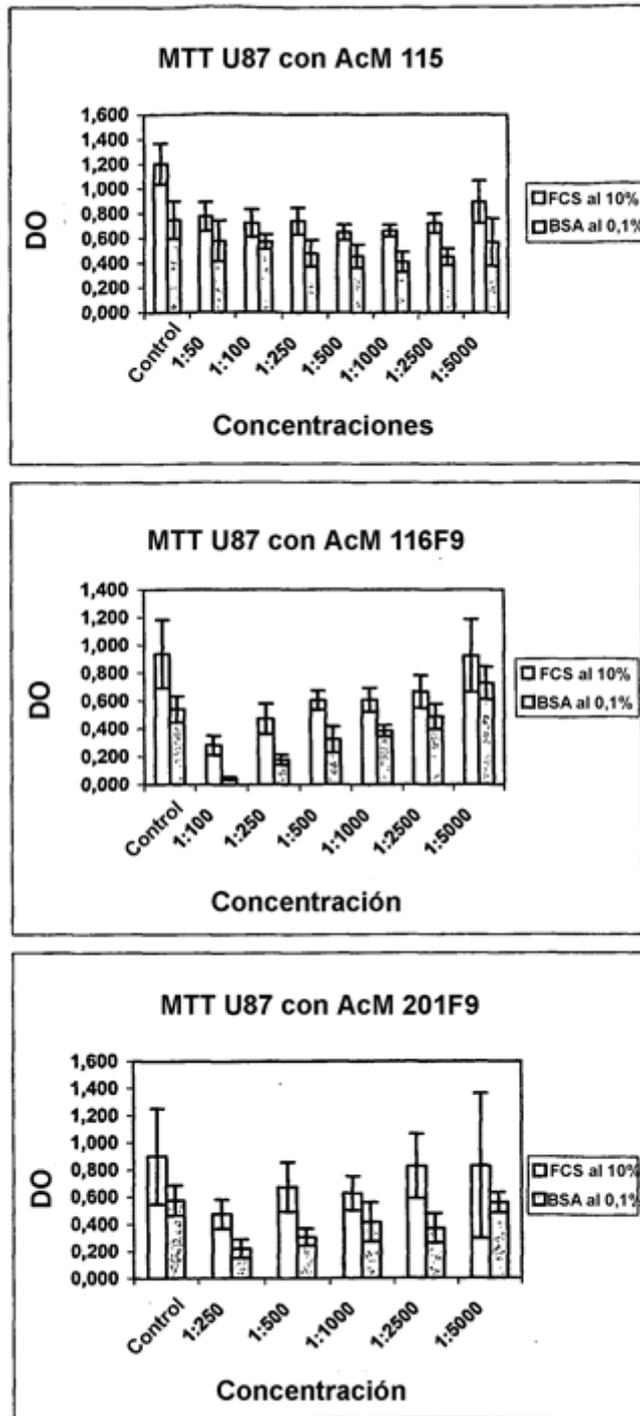


FIG. 1

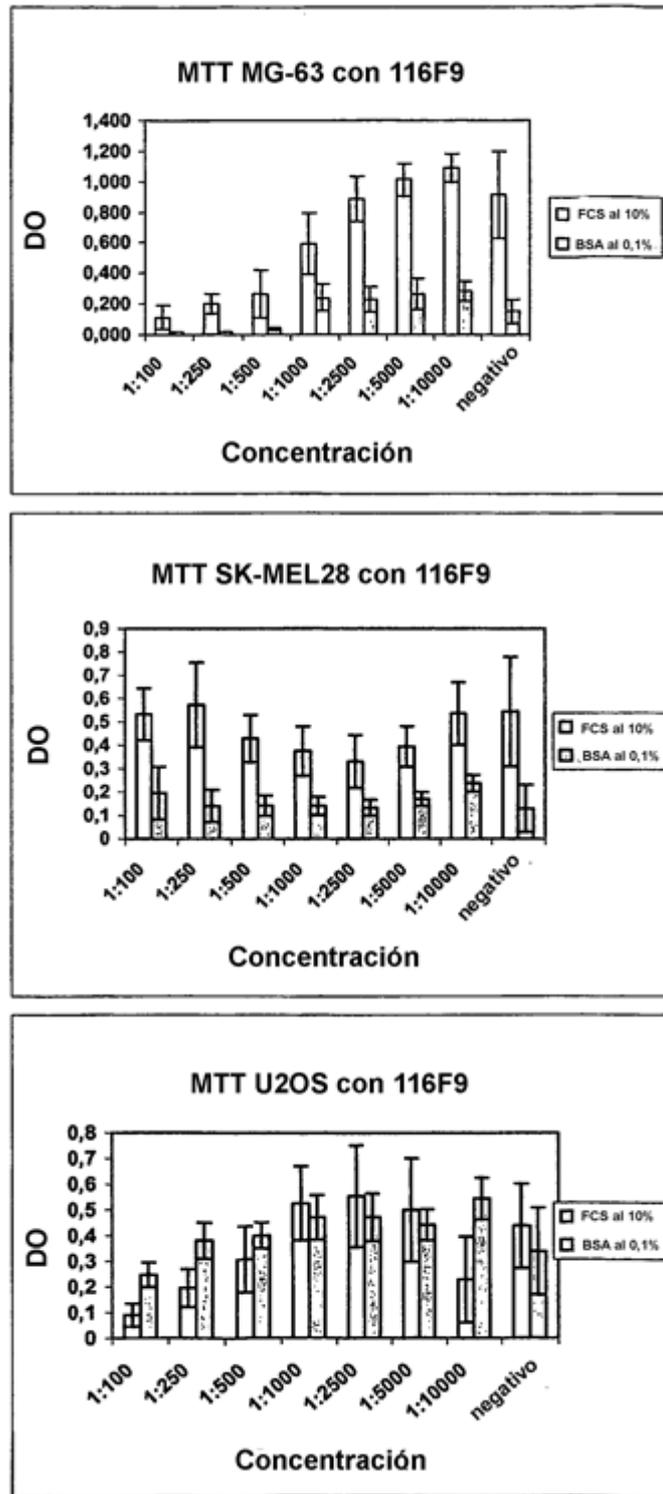
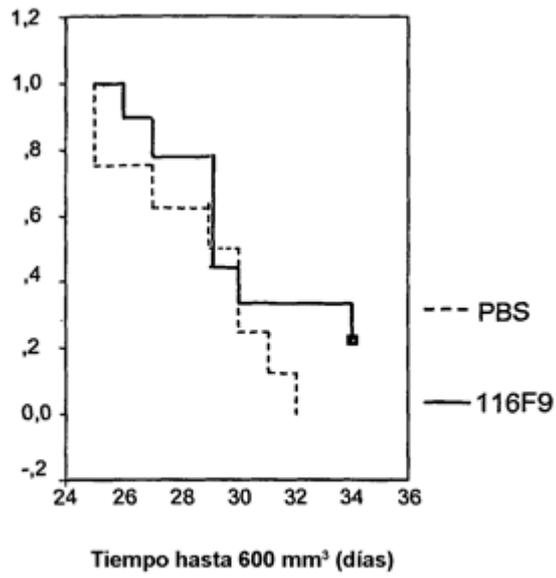


FIG.2

Tumores U87 tratados con AcM 116F9



Tumores U87 tratados con AcM 201F9

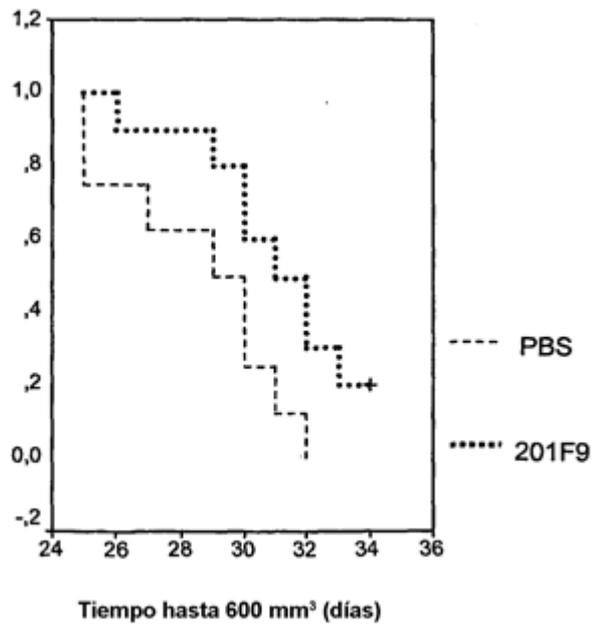


FIG. 3

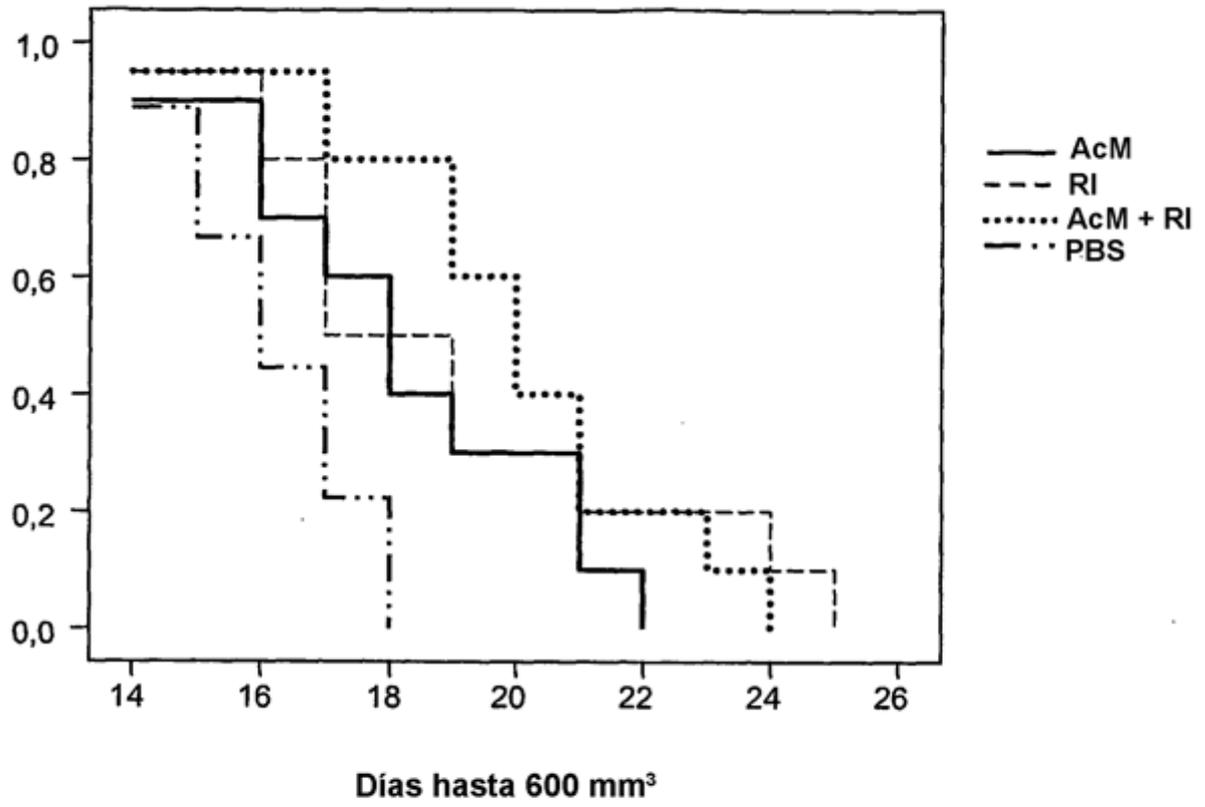
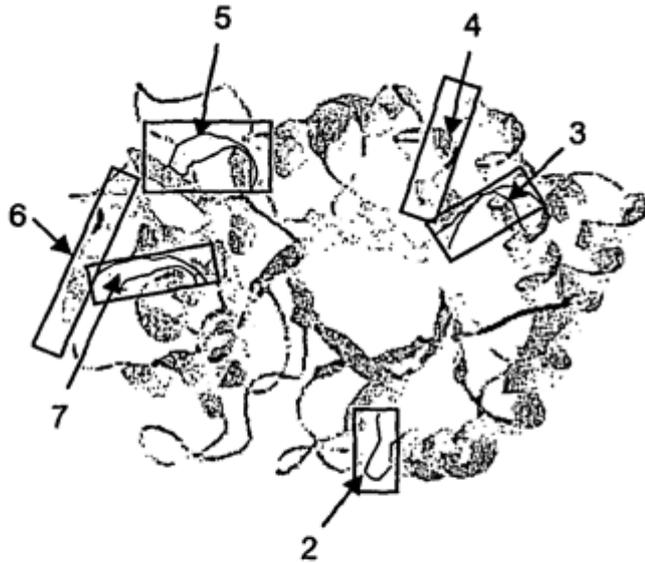


FIG. 4



- | | |
|----------------|----------------|
| 2. LKNRNPNL | (SEQ ID NO: 2) |
| 3. VGGWNFGSQR | (SEQ ID NO: 3) |
| 4. LAWLYPGRRDK | (SEQ ID NO: 4) |
| 5. GAWRGTTGHHS | (SEQ ID NO: 5) |
| 6. RGATVHRTLQ | (SEQ ID NO: 6) |
| 7. YATKGNQWVGY | (SEQ ID NO: 7) |