

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 498**

51 Int. Cl.:
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04725641 .7**
96 Fecha de presentación: **04.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1610678**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.01.2006**

54 Título: **ANTICUERPOS PARA INHIBIR LA ACTIVIDAD DE MMP-2 Y MMP-9.**

30 Prioridad:
04.04.2003 US 460005 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2011

73 Titular/es:
**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD.
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:
**SAGI, Irit y
DANON, Tamar**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 369 498 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

Anticuerpos para inhibir la actividad de MMP-2 y MMP-9

5 **Campo y antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de los mismos que inhiben la actividad de MMP-2 y MMP-9 usados para tratar cáncer metastásico como se caracteriza en las reivindicaciones.

10 Las metaloproteínas de matriz (MMP) son enzimas clave que participan en la remodelación de la matriz extracelular (MEC). Estas enzimas son capaces de destruir una variedad de componentes de tejido conjuntivo de cartílago articular o membranas basales.

15 La familia de genes de MMP humanos consiste en al menos 28 proteínas estructuralmente relacionadas (véase la figura 1), que comparten una topología esférica global similar (figura 2 y Borkakoti, 1998). Cada MMP se secreta como una proenzima inactiva, latente. El dominio de zinc catalítico está compuesto de alrededor de 180 aminoácidos en donde la secuencia altamente conservada HE-GH-LGL-H proporciona los tres residuos de histidina (es decir, H) que se unen al ión metálico Zn(2+). El cuarto sitio de unión del ión de zinc catalítico en la proenzima se une a un residuo de cisteína (Morgunova et al., 1999), que tras la activación de la enzima se disocia del sitio activo (Van Wart y Birkedal-Hansen, 1990). Como resultado, el cuarto sitio de unión en las MMP activadas lo ocupa una molécula de agua, que también está unida por puentes de hidrógeno a un residuo conservado de glutámico. Este proceso facilita la hidrólisis de un enlace peptídico del sustrato diana con la molécula de agua activada.

25 La rotura incontrolada de tejido conjuntivo por metaloproteasas es una característica de muchas afecciones patológicas, probablemente resultante de un exceso de actividad MMP o de una relación desequilibrada entre los inhibidores tisulares naturales de MMP (TIMP) y las MMP. Los TIMP inhiben las MMP mediante la formación de complejos estequiométricos con el sitio activo de unión a zinc de las MMP (Gomez et al., 1997; Henriot et al., 1999; Bode et al., 1999; Will et al., 1996). Cuando los niveles de los TIMP son insuficientes, una degradación lenta progresiva de la MEC puede producir la pérdida de matriz cartilaginosa en artritis reumatoide (Walakovits et al., Arthritis Rheum, 35:35-42, 1992) y artrosis (Dean et al., J. Clin. Invest. 84:678-685, 1989) o degradación de matriz ósea (Hill et al., Biochem. J. 308: 167-175, 1995). En otras situaciones, tal como insuficiencia cardiaca congestiva, se puede producir la degradación rápida de la MEC del corazón (Armstrong et al., Canadian J. Cardiol. 10: 214-220, 1994).

35 Otras afecciones patológicas, que también están relacionadas con la actividad no regulada de las MMP, incluyen la remodelación rápida de la MEC por células tumorales metastásicas. En tales afecciones las MMP activadas o bien se expresan por las células cancerosas o por los tejidos circundantes. Hay evidencia considerable de que las MMP están implicadas en el crecimiento y expansión de tumores (por ejemplo, véase, Davidson et al., Chemistry & Industry, 258-261, 1997, y las referencias en dicho documento). En el proceso de metástasis tumoral, las MMP se usan para romper la MEC, lo que permite que las células cancerosas del tumor primario invadan vasos sanguíneos próximos donde se transportan a diferentes órganos y establecen tumores secundarios. El crecimiento invasivo en estos sitios secundarios está mediado por las MMP, que rompen el tejido. Además, la actividad MMP contribuye al crecimiento hacia dentro de nuevos vasos sanguíneos, también denominado angiogénesis, que se requiere para que los tumores crezcan por encima de un cierto tamaño.

45 Dado el amplio papel de las MMP en fisiología y patología humanas, no es sorprendente que se hayan efectuado numerosos esfuerzos para diseñar fármacos, que inhiban la actividad excesiva de las MMP.

50 Los esfuerzos del descubrimiento de fármacos se han enfocado sobre clases de inhibidores que contienen un grupo funcional que coordina el ión de zinc para de esta manera inactivar la MMP diana. Una de tales clases de inhibidores es la de inhibidores hidroxamato, pequeños análogos peptídicos de colágenos fibrilares, que específicamente interaccionan de una manera bidentada a través de los oxígenos de hidroxilo y carbonilo del grupo hidroxámico con el ión de zinc en el sitio catalítico [Grams et al., (1995), Biochem. 34: 14012-14020; Bode et al., (1994), EMBO J., 13: 1263-1269].

55 Los inhibidores de MMP basados en hidroxamato habitualmente están compuestos de un esqueleto carbonado (documentos WO 95/29892, WO 97/24117, WO 97/49679 y EP 0780386), un esqueleto peptídico (documentos WO 90/05719, WO 93/20047, WO 95/09841 y WO 96/06074) o un esqueleto peptidomimético [Schwartz et al., Progr. Med. Chem., 29: 271-334(1992); Rasmussen et al., Pharmacol. Ther., 75: 69-75 (1997); Denis et al., Invest. New Drugs, 15: 175-185 (1997)]. De forma alternativa, contienen un grupo sulfonamido sulfonilo que está unido en un lado a un anillo de fenilo y un nitrógeno sulfonamido que está unido a un grupo hidroxamato a través de una cadena de uno a cuatro átomos de carbono (documento EP 0757984 A1).

65 Otros inhibidores de MMP basados en péptidos son tiolamidas que muestran actividad de inhibición de colagenasa (patente de EE UU No. 4.595.700), derivados N-carboxialquilo que contienen una bifeniletiglicina que inhiben MMP-

3, MMP-2 y colagenasa (Durette et al., WO 9529689), derivados lactamas que inhiben las MMP, TNF-alfa y agrecanasa (véase US 6.495.699) y compuestos tricíclicos de sulfonamida (véase US 6.492.422).

Aunque los inhibidores de MMP basados en péptidos tienen un potencial terapéutico claro su uso en terapia clínica está limitado. Los hidroxamatos basados en péptidos son caros de producir y tienen baja estabilidad metabólica y biodisponibilidad oral [por ejemplo, batimastat (BB-94)]. Estos compuestos de glucuronidan con rapidez, se oxidan a ácido carboxílico y se excretan en la bilis [Singh et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 5: 337-342, 1995; Hodgson, "Remodelling MMPs", Biotechnology 13: 554-557, 1995]]. Además, los inhibidores de MMP basados en péptidos con frecuencia muestran los mismos efectos inhibidores o similares contra cada una de las enzimas MMP. Por ejemplo, se ha descrito que batimastat muestra valores de CI_{50} de alrededor de 1 hasta alrededor de 20 nM contra cada una de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 y MMP-9 [Rasmussen et al., Pharmacol. Ther., 75(1): 69-75 (1997)]. Además el uso de varios inhibidores hidroxamatos se asoció con efectos secundarios graves tales como problemas musculosqueléticos con marimastat (BB-2516), exantema maculopapular extendido con CGS27023A (Novartis) [Levitt et al., 2001, Clin. Cancer Res. 7: 1912-1922] y anomalías hepáticas, anemia, dolor en el hombro y espalda, trombocitopenia, náusea, fatiga, diarrea y trombosis profunda de vena con BAY12-9566 (Bayer) [Heath et al., 2001, Cancer Chemother. Pharmacol. 48: 269-274]. Además, ensayos clínicos de fase III en pacientes de cáncer avanzado con marimastat, prinomastat (AG 3340, Agouron) y Bay 12-9566 no demostraron eficacia clínica en inhibir metástasis (Zucker et al., 2000, Oncogene 19: 6642-50).

Otros inhibidores de MMP son las tetraciclinas no microbianas químicamente modificadas (CMT) que se mostró que bloqueaban la expresión de varias MMP *in vitro*. Sin embargo, se encontró que la eficacia *in vivo* de estos compuestos era limitada, por ejemplo, el inhibidor CMT, doxiciclina, redujo los niveles tisulares de MMP-1 pero no de MMP-2, -3 o -9 en placas carótidas ateroscleróticas en pacientes humanos (Axisa et al., 2002, Stroke 33: 2858-2864).

Recientemente, se diseñó un inhibidor de MMP basado en mecanismo, SB-3CT, según la información cristalográfica de rayos X del sitio activo de MMP (Brown et al., 2000). Los estudios de absorción de rayos X revelaron que la unión de esta molécula al zinc catalítico reconstruye el medio conformacional alrededor del ión metálico del sitio activo de vuelta al de la proenzima [Kleinfeld et al., 2001, J Biol. Chem. 276: 17125- 31]. Sin embargo, la eficacia terapéutica obtenida con este agente aún se debe determinar.

Otra clase de inhibidores naturales son anticuerpos monoclonales. Se han producido varios anticuerpos contra secuencias peptídicas específicas en el dominio catalítico de MMP-1 (Galvez et al., 2001, J. Biol. Chem., 276: 37491-37500). Sin embargo, aunque estos anticuerpos pudieron inhibir la actividad *in vitro* de MMP, aún no se han demostrado resultados que demuestren la eficacia *in vivo* de tales anticuerpos.

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, el sitio catalítico de las MMP incluye un ión metálico coordinado que se vuelve disponible para la unión al sustrato después de la activación de la enzima (véanse las figuras 2a-c). Por tanto, es concebible que los anticuerpos convencionales dirigidos a la secuencia primaria de aminoácidos de la enzima no distinguirían la forma activa de la forma inactiva de la enzima y por tanto no servirían como inhibidores potentes de tales enzimas.

Mientras ponían en práctica la presente invención, los presentes inventores han descubierto que en marcado contraste con lo anterior, los anticuerpos que reconocen determinantes electrónicos y estructurales del sitio catalítico de las MMP son potentes inhibidores de las mismas y como tales se pueden usar para tratar enfermedades asociadas con actividad MMP desequilibrada.

Compendio de la invención

Según un aspecto se describe un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, que comprende una región de reconocimiento del antígeno capaz de unirse a un ión metálico y un quelante del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es capaz de inhibir una actividad de una metaloproteína.

Según otro aspecto, se describe un método de producir un inhibidor de metaloproteínas, el método comprende generar anticuerpos dirigidos a una composición que incluye un quelante unido a un ión metálico, en donde se selecciona la composición que tenga propiedades estructurales y electrónicas similares a un dominio funcional de la metaloproteína, produciéndose de esta manera el inhibidor de la metaloproteína.

Según aún otro aspecto se describe un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, que comprende una región de reconocimiento del antígeno capaz de unir un ión metálico y un quelante del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es capaz de inhibir una actividad de una metaloproteasa de matriz.

Según aún otro aspecto se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que incluye una región del reconocimiento de antígeno capaz de unir un ión metálico y un quelante del mismo y un soporte fisiológicamente aceptable, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es capaz de inhibir una actividad de un metaloproteasa de matriz.

Según un aspecto adicional, se describe un inhibidor de metaloproteasa de matriz que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que incluye una región de reconocimiento del antígeno capaz de unirse a un ión metálico y un quelante del mismo.

5 Según aún un aspecto adicional se describe un método para producir un inhibidor de metaloproteasa de matriz, el método comprende generar anticuerpos dirigidos a una composición que incluye un quelante unido a un ión metálico, en donde se selecciona la composición que tenga propiedades estructurales y electrónicas similares a un dominio catalítico de la metaloproteasa de matriz, produciendo de esta manera el inhibidor de la metaloproteasa de matriz.

10 Según aún un aspecto adicional se describe un método de inhibir la actividad de metaloproteasa en un sujeto en necesidad de la misma, el método comprende proporcionar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que incluye una región de reconocimiento del antígeno capaz de unirse a un ión metálico y un quelante del mismo, inhibiendo de esta manera la actividad de la metaloproteasa de matriz en el sujeto.

15 Según un aspecto más se describe un artículo de fabricación que comprende material de embalaje y una composición farmacéutica identificada para tratar enfermedades asociadas con actividad anormal de una metaloproteasa de matriz que está contenida dentro del material de embalaje, la composición farmacéutica incluye, como principio activo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que incluye una región de reconocimiento del antígeno capaz de unirse a un ión metálico y un quelante del mismo, en donde el anticuerpo o fragmento del anticuerpo es capaz de inhibir una actividad de la metaloproteasa de matriz.

20 Según características adicionales posteriormente, el ión metálico es un ión de un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en vanadio, selenio, molibdeno, cobalto, zinc, cobre, hierro, galio, bismuto, aluminio, oro, platino, manganeso, cromo, plata, antimonio, talio, cadmio, níquel, mercurio y plomo.

25 Según características aún adicionales descritas el quelante es una poliamina.

30 Según características aún adicionales descritas la poliamina tiene al menos dos moléculas de histidina.

35 Según características aún adicionales descritas la poliamina se selecciona del grupo que consiste en etilendiamina, ciclam, porfirina, dietilentriamina, trietilentetramina, trietilendiamina, tetraetilenpentamina, aminoetilanolamina, aminoetilpiperazina, pentaetilenhexamina, captopril, penicilamina, N,N'-bis(3-aminopropil)-1,3-propandiamina, N,N'-Bis-(2-aminoetil)-1,3-propandiamina, 1,7-dioxa-4,10-diazaciclododecano, 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-5,7-diona, 1,4,7-triazaciclononano, 1-oxa-4,7,10-triazaciclododecano, 1,4,8,12-tetraazaciclopentadecano y 1,4,7,10-tetraazaciclododecano.

40 Según características aún adicionales descritas la metaloproteína se selecciona del grupo que consiste en colagenasa de neutrófilos, colagenasa-3, gelatinasa A, gelatinasa B, estromelinas-2 y 3, matrilisina, elastasa de macrófagos; MMP de tipo membrana, agrecanasa, enzima convertidora de factor de necrosis tumoral, convertasas de citoquinas, enzimas de eliminación de moléculas de adhesión, enzima convertidora de endotelina, enzima convertidora de angiotensina, endopeptidasa neutra, FTSH – metaloproteasa bacteriana, metalo-lactamasa (carbapenasas), toxinas bacterianas y ras farnesil proteína transferasa y anhidrasa carbónica.

45 Según aún un aspecto adicional se describe un método de calificar la especificidad de un anticuerpo hacia un ión metálico y un quelante del mismo, el método comprende determinar los cambios conformacionales en la unión del ión metálico al quelante del mismo después de la unión del anticuerpo, para calificar de esta manera la especificidad del anticuerpo al ión metálico y el quelante del mismo.

50 Según características aún adicionales en las formas de realización preferidas descritas los anticuerpos son anticuerpos policlonales.

55 Según características aún adicionales en las formas de realización preferidas descritas los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

60 Según aún un aspecto adicional se describe un método de calificar la especificidad de un anticuerpo a un ión metálico y un quelante del mismo, el método comprende determinar los cambios electrónicos en el ión metálico después de la unión del anticuerpo, para calificar de esta manera la especificidad del anticuerpo al ión metálico y el quelante del mismo.

65 La presente invención aborda con éxito los defectos de las configuraciones actualmente conocidas al proporcionar anticuerpos contra metaloproteínas, tales como anticuerpos contra MMP, que se pueden usar para tratar cáncer metastásico.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente el experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen posteriormente. En caso de conflicto, la especificación de patente, que incluye definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no se pretende que sean limitantes.

Breve descripción de las figuras

La invención se describe en el presente documento, a modo de ejemplo solo, con referencia a las figuras acompañantes. Con referencia específica ahora a las figuras en detalle, se recalca que los particulares mostrados son a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de las formas de realización preferidas de la presente invención solo, y se presentan con motivo de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendida de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se hace ningún intento de mostrar los detalles estructurales de la invención en más detalle del que sea necesario para un entendimiento fundamental de la invención, la descripción junto con las figuras hacen aparente a los expertos en la materia cómo las diferentes formas de la invención se pueden realizar en la práctica.

En las figuras:

La figura 1 es una ilustración esquemática de la estructura de dominios de la familia de proteínas MMP adaptada de Nagase et al., 1999. Se muestran el péptido señal, propéptido, dominios catalítico, fibronectina de tipo II, enlazador y similar a hemopexina. Los diferentes grupos de organización de dominios (numerados de A hasta H) representan la estructura de las siguientes proteínas MMP: A: Matrilisina (MMP-7); B: Colagenasa 1 (MMP-1), Estromelisinina 1 (MMP-3), Colagenasa 2 (MMP-8), Estromelisinina 2 (MMP-10), Elastasa de macrófagos (MMP-12), Colagenasa 3 (MMP-13), Colagenasa 4 (Xenopus, MMP-18), MMP-19, Enamelisina (MMP-20), CMMP (pollo, MMP-22); C: Gelatinasa A (MMP-2); D: Gelatinasa B (MMP-9); E: Estromelisinina 3 (MMP-11); F: MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMT -15), MT3 (MMP-16), MT4 (MMP-17); G: XMMP (Xenopus, MMP-21); y H: MMP-23.

La figura 2a es una ilustración esquemática que representa la estructura tridimensional de proMMP-2 adaptada del banco de datos de proteínas (PDB): 1CFK (<http://www.rcsb.org/pdb>) que demuestra los dominios estructurales de proMMP-2: el prodominio (rojo), el dominio catalítico (azul), los dominios de fibronectina tipo II 1-3 (verde) y el dominio de hemopexina (amarillo).

La figura 2b es una ilustración esquemática de un alineamiento estructural de los sitios catalíticos en MMP-2, MMP-9 y TACE.

La figura 2c es una ilustración esquemática del alineamiento estructural de la figura 2b centrándose en el dominio de unión a metal.

La figura 3 es una ilustración esquemática que representa la estructura molecular del hapteno Co/Zn-TCPP en donde "M" representa Co o Zn.

La figura 4 es una curva de titulación del anticuerpo monoclonal purificado contra Co-TCPP. Se añadieron diluciones en serie del anticuerpo monoclonal contra Co-TCPP a placas de microtitulación recubiertas con el hapteno tetracarboxifenilporfirina Co(II) (Co-TCPP). Se midió la absorbancia de los anticuerpos unidos a 280 nm y se representó frente el logaritmo de la concentración del anticuerpo.

La figura 5 es una ilustración gráfica que representa un ensayo de inhibición competitiva de unión del anticuerpo monoclonal contra Co-TCPP purificado a los haptenos indicados. El anticuerpo se incubó (a la CI_{50}) con los haptenos Co-TCPP (púrpura), TCPP (azul), Zn-TCPP (amarillo), Zn-TTP (azul claro) a las concentraciones indicadas y se calculó la fracción relativa de anticuerpos unidos (% de unión).

Las figuras 6a-b son gráficos de Lineweaver-Burk de MMP-2 y MMP-9 que representan la hidrólisis de un sustrato fluorogénico en presencia de anticuerpo monoclonal contra Co-TCPP. Se incubaron las proteínas del dominio catalítico de MMP-2 (figura 6a) y MMP-9 de longitud completa (figura 6b) con concentraciones crecientes del sustrato fluorogénico Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ en presencia de 6 μ M (figuras 6a-b, cuadrados púrpuras), 18 μ M (figuras 6a-b, triángulos amarillos), 24 μ M (figuras 6a-b, X azules claras) o ausencia (figuras 6a-b, rombos azules) del anticuerpo.

La figura 7a ilustra un ensayo de inmunoprecipitación (IP) de MMP-2 con el anticuerpo monoclonal contra Co-TCPP. Se muestra un gel de SDS-PAGE cargado con las fases soluble o precipitado obtenidas de los siguientes experimentos de IP; Incubación de MMP-2 con bolas de proteína A (figura 7a, carril 1: soluble, carril 2: precipitado); incubación del anticuerpo con bolas de proteína A (carril 3: soluble, carril 4: precipitado); incubación de MMP-2 con bolas de proteína A-anticuerpo preasociado (carril 5: soluble, carril 6: precipitado); Incubación de proteína de caja DEAD A (DbpA) con proteína A-anticuerpo preasociado (carril 7: soluble, carril 8: precipitado) e incubación de MMP-

2 con anticuerpo (carril 9: soluble). El marcador de peso molecular (1 μ g) se muestra en el carril 10. Las bandas se visualizaron usando tinción con azul de Coomassie.

La figura 7b ilustra un ensayo de inmunoprecipitación de una MMP-2 sin zinc. Se muestra un SDS-PAGE de las fases soluble (carril 1) o precipitado (carril 2) obtenidas mediante incubación de la MMP-2 sin zinc con bolas de proteína A-anticuerpo preasociado. Las bandas se visualizaron usando tinción con azul de Coomassie.

La figura 7c ilustra un ensayo de inmunoprecipitación de MMP-2 en presencia o ausencia del inhibidor de MMP GM-6001. Se muestra un SDS-PAGE de las fases del precipitado o soluble obtenidas mediante la incubación de MMP-2 con bolas de proteína A-anticuerpo preasociado (fase del precipitado: carril 1) o mediante la incubación de MMP-2 con bolas de proteína A-anticuerpo preasociado en presencia de GM-6001 (fase soluble: carril: 2, fase del precipitado: carril 3). El marcador de peso molecular (1 μ g) se muestra en el carril 4. Las bandas se visualizaron usando tinción con azul de Coomassie.

Las figuras 8a-b ilustran los espectros de Zinc de límite K de MMP-2. Se muestran los datos de espectroscopía de absorción de rayos X (XAS) normalizados de las formas de longitud completa latente (figuras 8a-b, verde), activa (figuras 8a-b, negro) e inhibida (figuras 8a-b, rojo) de MMP-2. Nótese el pequeño pico a 9680 eV (figura 8a, flecha 1) y la ausencia de hendidura a 9730 eV (figura 8a, flecha 2) en la enzima inhibida. Nótese también el distinto cambio de 0,86 electronvoltios (eV) a mayor energía entre las enzimas activa e inhibida (figura 8b).

La figura 9 ilustra un análisis de estructura fina por absorción de rayos X extendida (EXAFS) del inmunocomplejo anticuerpo monoclonal-Zinc. Los resultados se presentan en el espacio R de los datos experimentales (negro) o contribuciones del ligando zinc teóricas simuladas (rojo).

La figura 10 es un análisis de SDS PAGE que demuestra la unión de acetato 4-aminofenilmercurio (APMA) a inmunocomplejos de MMP-2. Se incubó el dominio catalítico de MMP-2 recombinante con bolas de proteína A-anticuerpo preasociado en presencia o ausencia del activador de MMP, APMA. Se muestra un SDS-PAGE de las fases soluble o del precipitado obtenidas después de la incubación de MMP-2 con bolas de proteína A-anticuerpo preasociado (carril 1, fase del precipitado) o incubación de MMP-2 con bolas de proteína A-anticuerpo preasociado en presencia de APMA (figura 10, carril 2: soluble, carril 3: precipitado). Las bandas se visualizaron con tinción con azul de Coomassie.

Las figuras 11a-b son fotomicrografías que representan la capacidad del Acm de la presente invención para bloquear la proteólisis pericelular generada por células cancerosas de fibrosarcoma muy invasivas (HT1080), determinado mediante ensayo de zimografía in situ. La figura 11a muestra la actividad proteolítica pericelular de células HT1080 que expresan MMP (en azul claro; los núcleos celulares están teñidos con DAPI). La figura 11b muestra la actividad proteolítica pericelular de células HT1080 en presencia del Acm (1 μ g). Nótese, que la proteólisis pericelular mediada por MMP que aparece con intensidad verde alrededor de la membrana celular (figura 11a) desaparece tras la incubación de las células con el Acm (figura 11b).

Descripción de las formas de realización preferidas

La presente invención es de anticuerpos y fragmentos de los mismos usados para tratar cáncer metastásico e inhibir la actividad de MMP-2 y MMP-9.

Los principios y operación de la presente invención se pueden entender mejor con referencia a las figuras y descripciones acompañantes.

Antes de explicar al menos una forma de realización de la invención en detalle, se debe entender que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles explicados en la siguiente descripción o ejemplificados por los ejemplos. La invención es capaz de otras formas de realización o de que se practique o lleve a cabo de varias maneras. Además, se debe entender que la fraseología y terminología empleada en el presente documento es para el fin de descripción y no se debe considerar como limitante.

Las metaloproteasas de matriz participan en muchos procesos biológicos, que varían desde proliferación celular, diferenciación y remodelación de la matriz extracelular (MEC) a vascularización y migración celular. Estos procesos requieren un delicado equilibrio entre las funciones de las metaloproteasas de matriz (MMP) y los inhibidores tisulares naturales de las mismas (TIMP). La pérdida de este equilibrio es el sello de numerosas afecciones patológicas que incluyen tumores metastásicos, enfermedades neurodegenerativas y artrosis.

En la técnica se conocen numerosos inhibidores de MMP incluyendo inhibidores peptídicos pequeños tales como hidroxomato, tetraciclinas no microbianas y anticuerpos monoclonales. Mientras que los primeros están limitados por el alto coste de producción, alta degradabilidad, baja biodisponibilidad oral y falta de especificidad, ninguno de los últimos ha demostrado eficacia terapéutica in vivo.

Mientras ponían en práctica la presente invención y mientras buscaban una nueva modalidad terapéutica para afecciones clínicas asociadas con actividad desequilibrada de metaloenzimas, los presentes inventores han descubiertos que se pueden usar anticuerpos que reconocen tanto determinantes electrónicos como estructurales del sitio catalítico de metaloenzimas como potentes inhibidores de las mismas.

Estos descubrimientos permiten, por primera vez, generar anticuerpos terapéuticos muy eficaces que se pueden usar para tratar afecciones clínicas caracterizadas por actividad elevada de metaloproteínas.

Por tanto, se proporciona un método de producir un inhibidor de metaloproteínas.

El método se realiza mediante la generación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos dirigidos a una composición que incluye un quelante unido a un ión metálico. Se selecciona tal composición que tenga propiedades estructurales y electrónicas similares a un dominio funcional, tal como un dominio catalítico o un dominio de unión al sustrato, de la metaloproteína.

Como se usa en el presente documento una "metaloproteína" se refiere a una proteína que incluye un ión metálico unido como parte de la estructura de la misma. El ión metálico se puede requerir para la actividad enzimática (es decir, metaloenzima), bien participando directamente en la catálisis o estabilizando la conformación activa de la proteína.

Se apreciará que todos los miembros de la familia MMP se traducen como enzimas latentes, que tras la activación se convierten en enzimas activas en las que el ión metálico en el sitio activo está accesible para la unión del sustrato. Por ejemplo, se ha sugerido previamente el "modelo de interruptor de cisteína" para explicar la activación in vitro de MMP. El modelo de interruptor de cisteína sugiere que tras la activación, el sitio de unión a zinc latente se convierte a un sitio de unión a zinc catalítico mediante disociación del propéptido que tiene tiol (Cys) del átomo de zinc. El corte del propéptido produce una rotura de la estructura de prodominios de la enzima, y se retira el revestimiento del ión de zinc catalítico. Por consiguiente, el ión metálico y el bolsillo del sitio activo están accesibles para la unión del sustrato e hidrólisis [Van Wart y Birkedal-Hansen (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5578-5582].

De forma diferente a los anticuerpos del estado de la técnica, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos para uso en la presente invención sirven como potentes inhibidores de las MMP, debido a su capacidad de unirse tanto al ión metálico como a los aminoácidos coordinantes en el sitio catalítico de zinc, lo que por tanto inhibe específicamente la conformación activa de estas enzimas que están directamente implicadas en procesos patológicos como se ha descrito anteriormente.

Ejemplos de metaloenzimas que se pueden inhibir usando las enseñanzas descritas en el presente documento incluyen, pero no están limitadas a, colagenasa de neutrófilos, colagenasa-3, gelatinasa A, gelatinasa B, estromelisin-2 y 3, matrilisina, elastasa de macrófagos; MMP de tipo membrana, agreganasa, convertasas de citoquinas, "enzimas de eliminación" de moléculas de adhesión, enzima convertidora de endotelina, enzima convertidora de angiotensina, endopeptidasa neutra, FTSH – metaloproteasa bacteriana, metalo-lactamasa (carbapenemasas), toxinas bacterianas, por ejemplo, toxinas del tétanos o botulismo, ras farnesil proteína transferasa, anhidrasa carbónica y similares. Otros ejemplos de metaloenzimas se divulgan en Hodgson, Bio/Technology, 13:554 (1995); Gordon, et al., Clin. Exper. Rheum., 11(8):S91-S94 (1993); Ray, et al., Eur. Respir. J., 7:2062-2072 (1994); O'Connor, et al., Thorax, 49: 602-609 (1994); Docherty, et al., Tibtech, Vol. 10, (1992); Newby, et al., Basic Res. Cardiol., 89 (Supl):59-70; Freije, et al., J. Biol. Chem., 269(24):16766-16773 (1994); Shapiro, et al., J. Biol. Chem., 268(32):23824-23829 (1993); Belaaouaj, et al., J. Biol. Chem., 27(24):14568-14575 (1995); Gearing, et al., Letters to Nature, Nature, 370:555-557 (1994); McGeehan, et al., Letters to Nature, Nature, 370:558-561 (1994); Mohler, et al., Letters to Nature, Nature, 370:218-220 (1994); Sato, et al., Letters to Nature, Nature, 370:61-65 (1994); Crowe, et al., J. Exp. Med., 181:1205-1210 (1995); Payne, J. Med. Microbiol., 32:93-99 (1993); Deshpande, et al., Toxicon, 33(4):551-557 (1995); DePhillips, et al., Eur. J. Biochem., 229:61-69 (1995).

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, se puede usar cualquier composición que incluya un ión metálico unido a un quelante del mismo para generar los anticuerpos descritos en el presente documento, siempre que tenga propiedades estructurales y electrónicas (es decir, carga, por ejemplo, distribución y/o densidad de carga) similares a las de un dominio funcional de la metaloproteasa. Aunque se prefiere el uso del dominio real quelante unido a ión metálico de la metaloproteína en la generación de anticuerpos, se apreciará que en casos en donde tal dominio está bien caracterizado, se pueden sintetizar y usar estructuras que mimeticen las propiedades estructurales y electrónicas de este dominio, los métodos de sintetizar tales quelantes unidos a iones metálicos se describen en detalle posteriormente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento el ión metálico se refiere a un ión de metal de transición o cualquier otro metal fisiológico. Ejemplos de tales iones metálicos incluyen, pero no están limitados a, vanadio, selenio, molibdeno, cobalto, zinc, cobre, hierro, galio, bismuto, aluminio, oro, platino, manganeso, cromo, plata, antimonio, talio, cadmio, níquel, mercurio, plomo, magnesio y calcio.

Se apreciará que aunque cada uno de los iones de los metales de transición descritos anteriormente se puede incluir en las composiciones de inmunización de este aspecto, un ión metálico preferido es el coordinado con la secuencia quelante de la metaloproteína natural. Por ejemplo, puesto que las MMP naturales incluyen zinc en el dominio catalítico, un ión metálico preferido según este aspecto es zinc o sus iones análogos cobalto o cadmio.

Como se usa en el presente documento, el término “quelante” se refiere a un quelante de metales de transición, que incluye al menos dos átomos capaces de coordinar un metal indicado para formar un anillo.

Como se sabe bien en la técnica, se consideran una o más moléculas como quelantes de metales de transición si la formación de un complejo cíclico de la(s) molécula(s) con un ión del metal de transición produce un “efecto quelato”. La frase “efecto quelato” se refiere a la estabilidad aumentada de un sistema en complejo que contiene el quelato, comparado con la estabilidad de un sistema que es tan similar como sea posible pero no contiene ninguno o menos anillos. Los parámetros para evaluar el efecto quelato de un quelato típicamente incluyen los cambios de entalpía y entropía (ΔH y ΔS), según la siguiente ecuación:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln \beta$$

en donde β es la constante de equilibrio de la formación del quelato y por tanto representa el efecto quelato. Los quelatos de metales de transición se refieren a complejos, que incluyen un ión de transición y uno o más quelante(s) de iones de transición en complejo con los mismos, que se caracterizan por un valor de β grande.

Ejemplos de quelantes de metales de transición incluyen, pero no están limitados a, moléculas de poliaminas tales como porfirinas, etilendiamina y ciclam, que forman quelatos metálicos con efecto quelato aumentado.

Otros ejemplos de quelantes de metales incluyen dietilentriamina, di-(monoalquilamino)-alcano, trietilentetramina, trietildiamina, tetraetilenpentamina, aminoetiletanolamina, aminoetilpiperazina, pentaetilenhexamina, captopril, penicilamina, N,N'-bis(3-aminopropil)-1,3-propandiamina, N,N'-Bis-(2-aminoetil)-1,3-propandiamina, 1,7-dioxa-4,10-diazaciclododecano, 1,4,8,11-tetraaza-ciclotetradecan-5,7-diona, 1,4,7-triazaciclononano, 1-oxa-4,7,10-triazaciclododecano, 1,4,8,12-tetraazaciclopentadecano y 1,4,7,10-tetraazaciclododecano. Para una discusión adicional sobre quelantes de metales por Ross y Frant, Chelometric indicators, titration with the solid state cupric ion selective electrode. (1969) Analytical Chemistry 41:1900.

Se apreciará que también se pueden usar quelantes peptídicos según este aspecto descrito en el presente documento. La patente de EE UU No. 5.679.548 divulga un método de generar tales quelantes.

En cualquier caso como se ha descrito anteriormente la composición quelante se selecciona basándose en las propiedades estructurales y electrónicas de dominio real en el polipéptido diana. Típicamente, el polipéptido diana incluye 3 aminoácidos que proporcionan tres puntos de contacto requeridos para la coordinación del metal de transición. Las geometrías representativas de complejos de transición pueden ser tetraédrica, planar cuadrada o trigonal dependiendo del ión del metal de transición. En general las composiciones mimetizantes de la presente invención se seleccionan basándose en la estructura de la cadena lateral del aminoácido y la geometría de coordinación. Típicamente, los aminoácidos que pueden coordinar unión de metales de transición son histidina, arginina, glutamato, cisteína, metionina, triptófano, serina, treonina y tirosina, siendo preferibles los dos primeros.

Histidina, arginina y triptófano tienen un grupo amino que puede coordinar un átomo de un metal de transición. En la histidina, el grupo amino está localizado en un anillo de imidazol cíclico y por tanto los electrones del par solitario (lpe) del nitrógeno están más disponibles para coordinación, comparados con aminas alifáticas tal como en arginina.

En el triptófano, el grupo amino está localizado en un anillo de imidazol que está conjugado a un anillo arilo y por tanto, su lpe está menos disponible puesto que participa en el sistema π de electrones.

Típicamente, cualquier compuesto que tenga un grupo amino alifático o alicíclico (es decir, sustituido o sin sustituir) puede mimetizar el efecto quelante de estos aminoácidos, con preferencia a compuestos similares a imidazol tal como porfirina. Se apreciará que la lisina también tiene un grupo amino alifático, sin embargo, en condiciones de pH neutro el grupo amino se protona y por tanto no puede coordinar iones de transición.

Cisteína y metionina tienen un grupo que contiene azufre (es decir, -SH y -S-, respectivamente), que también pueden coordinar un átomo de metal de transición. Cualquier compuesto que incluya tal grupo puede ejercer el mismo efecto quelante.

Tirosina, serina y treonina tienen un grupo hidroxilo, aromático (tirosina) o alifático (serina y treonina), que ejerce un efecto quelante menos preferible, debido a la posible oxidación del metal. Cualquier compuesto que incluya tal grupo o, de forma alternativa, un grupo que contenga oxígeno tal como éter (-O-), puede ejercer el mismo efecto quelante.

Los métodos de producir las composiciones descritas en el presente documento se conocen bien en la técnica. Se divulgan protocolos generales de inserción de metales en Smith, "Porphyrins and Metalloporphyrins, K. M. Smith ed., Elsevier Scientific Publishing Co., Nueva York, (1975).

5 Se divulga un procedimiento específico para sintetizar metaloporfirinas a baja temperatura (es decir, 40°) en la patente de EE UU No. 6.420.553.

10 Brevemente, se pueden usar compuestos hidrofóbicos o hidrofílicos de porfirina que tengan al menos un anillo o anillos de porfirina y opcionalmente que tengan varios grupos sustituyentes como materiales de partida que permiten la inserción de un ión de metal de transición.

15 Las sales de metales de transición que se van a formar en complejos con tales compuestos de porfirina pueden ser cualquiera de varias sales de los metales de transición, descritos anteriormente en el presente documento, que sean capaces de hacer al menos dos enlaces formales. La sal de tal metal de transición puede ser cualquiera de varios ácidos inorgánicos, tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y varios ácidos orgánicos. La sal del metal de transición se usa preferiblemente en un exceso molar sobre la porfirina del material de partida.

20 Mientras se realiza la reacción, la porfirina del material de partida y la sal del metal de transición se disuelven cada una en un solvente independiente y las soluciones resultantes se combinan.

25 El solvente para disolver la porfirina del material de partida se selecciona según la hidrofobicidad de la porfirina. Se usa preferiblemente un solvente que tenga un gran poder solubilizante para la porfirina y capaz de proporcionar una solución homogénea. Por ejemplo, cuando se hace reaccionar una porfirina hidrofóbica, se usan preferiblemente solventes orgánicos hidrofóbicos. Por tanto, se pueden usar hidrocarburos halogenados, hidrocarburos aromáticos, nitrilos y similares.

De forma alternativa, cuando la porfirina del material de partida es hidrofílica, se usan preferiblemente solventes hidrofílicos tales como, agua, alcoholes, aminas, compuestos heterocíclicos nitrogenados.

30 Las soluciones homogéneas preparadas de esta manera, se combinan en presencia de una sustancia básica o compuesto básico. Se puede asegurar la presencia de una sustancia básica, por ejemplo, mediante el uso de una sustancia básica como el solvente cuando es una amina o un compuesto heterocíclico nitrogenado o mediante la adición de una sustancia básica a la solución combinada, o incluso mediante el uso de tales procedimientos en combinación. La cantidad relativa del solvente y sustancia básica puede variar.

35 Ejemplos de sustancias básicas que se pueden usar incluyen, pero no están limitados a, compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno tales como piridina, metilpiridina, dimetilpiridina, diazinas, metildiazinas, pirazina, etilpirazina, pirimidina, piperazina, morfolina; aminas alifáticas tales como dietilamina, etilendiamina, tert-butilamina, resinas básicas; y bases inorgánicas.

40 La reacción preferiblemente se realiza a 40°C, aunque condiciones de temperaturas más bajas (es decir, temperatura ambiente) también pueden mediar la reacción.

45 Una vez se completa la reacción, el producto de reacción se puede aislar y purificar por varios procedimientos tales como cromatografía, precipitación, recristalización y similares.

De forma alternativa, las composiciones descritas en el presente documento se pueden obtener de forma comercial tal como de Frontier Scientific Porphyrin Products (www.porphyrin.com).

50 En cualquier caso, una vez se ha obtenido la composición, se usa para generar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra la misma.

55 Como se usa en el presente documento el término "anticuerpo" se refiere a una molécula intacta de anticuerpo y la frase "fragmento de anticuerpo" se refiere a un fragmento funcional del mismo, tal como Fab, F(ab')₂ y Fv que son capaces de unirse a macrófagos. Estos fragmentos funcionales de anticuerpo se definen como sigue: (i) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, se puede producir por digestión del anticuerpo entero con la enzima papaína para dar una cadena ligera intacta y una parte de una cadena pesada; (ii) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que se puede obtener mediante tratamiento del anticuerpo entero con pepsina, seguido por reducción, para dar una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (iii) F(ab')₂, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener mediante tratamiento del anticuerpo entero con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos unidos por dos puentes disulfuro; (iv) Fv, definido como un fragmento genéticamente manipulado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; (v) anticuerpo de cadena única ("SCA"), una molécula genéticamente manipulada que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena

pesada, unidas por un polipéptido enlazador adecuado como una molécula de cadena única genéticamente fusionada; y (vi) péptidos que codifican una región determinante de complementariedad (CDR) única.

Los métodos para generar anticuerpos (es decir, monoclonales y policlonales) se conocen bien en la técnica. Se pueden generar anticuerpos a través de cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, métodos que pueden emplear inducción de producción in vivo de moléculas de anticuerpos, cribado de librerías de inmunoglobulinas o paneles de reactivos de unión muy específicos como se ha descrito [Orlandi D.R. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3833-3837, Winter G. et al. (1991) Nature 349:293-299] o generación de moléculas de anticuerpos monoclonales por líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero no están limitadas a, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de células B humanas, y la técnica del hibridoma de virus de Epstein Bar (EVB) [Kohler G., et al. (1975) Nature 256:495-497, Kozbor D., et al. (1985) J. Immunol. Methods 81:31-42, Cote R.J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030, Cole S.P. et al. (1984) Mol. Cell. Biol. 62:109-120].

En casos donde los compuestos descritos son demasiados pequeños para provocar una respuesta inmunogénica fuerte, tales antígenos (haptenos) se pueden acoplar a soportes antigénicamente neutros tales como soportes de hemocianina de lapa californiana (KLH) o seroalbúmina [por ejemplo, seroalbúmina bovina (BSA)] (véanse las patentes de EE UU No. 5.189.178 y 5.239.078 y el ejemplo 2 de la sección de ejemplos). El acoplamiento a soportes se puede realizar usando métodos bien conocidos en la técnica; por ejemplo, se puede realizar el acoplamiento directo de grupos amino y opcionalmente seguido por la reducción de enlaces imino formados. De forma alternativa, se puede acoplar el soporte usando agentes de condensación tales como diciclohexilcarbodiimida u otros agentes deshidratantes carbodiimidados. También se pueden usar compuestos enlazadores para realizar el acoplamiento; están disponibles enlazadores tanto homobifuncionales como heterobifuncionales de Pierce Chemical Company, Rockford, Ill. El complejo inmunogénico resultante se puede inyectar después en sujetos mamíferos adecuados tales como ratones, conejos y similares. Los protocolos adecuados implican la inyección repetida del inmunógeno en presencia de adyuvantes según un programa que induce la producción de anticuerpos en el suero. Los títulos del suero inmune se pueden medir fácilmente usando procedimientos de inmunoensayos que se conocen bien en la técnica.

Los antisueros obtenidos se pueden usar directamente o se pueden obtener anticuerpos monoclonales como se ha descrito en el presente documento anteriormente.

Se pueden obtener fragmentos de anticuerpos usando métodos bien conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988). Por ejemplo, se pueden preparar fragmentos de anticuerpos para su uso según la presente invención mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en células de *E. coli* o de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) del ADN que codifica el fragmento.

De forma alternativa, se pueden obtener fragmentos de anticuerpos mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos por métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpos mediante corte enzimático de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento de 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento se puede cortar adicionalmente usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo resultantes del corte de los puentes disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' de 3,5S. De forma alternativa, un corte enzimático usando pepsina produce dos fragmentos monovalentes Fab' y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Goldenberg, patentes de EE UU no. 4.036.945 y 4.331.647, y las referencias contenidas en las mismas. Véase también Porter, R. R., Biochem. J., 73: 119-126, 1959. También se pueden usar otros métodos de cortar anticuerpos, tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada, corte adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que reconoce el anticuerpo intacto.

Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659-62, 1972. De forma alternativa, las cadenas variables se pueden unir por un enlace disulfuro intermolecular o entrecruzar mediante agentes químicos tal como glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L unidas por un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión al antígeno de cadena única (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios de V_H y V_L unidos por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que se introduce posteriormente en una célula huésped tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Los métodos para producir los sFv se describen, por ejemplo, en Whitlow y Filpula, Methods, 2: 97-105, 1991; Bird et al., Science 242:423-426, 1988; Pack et al., Bio/Technology 11:1271-77, 1993; y Ladner et al., patente de EE UU No. 4.946.778.

Se pueden obtener péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry, Methods, 2: 106-10, 1991.

Se apreciará que para terapia o diagnóstico humano, se usan preferiblemente anticuerpos humanizados. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras secuencias de unión a antígenos de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se sustituyen residuos marco de Fv de la inmunoglobulina humana por residuos correspondientes no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente 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 FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también incluirá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se conocen bien en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia residuos importados, que típicamente se toman de un dominio variable importado. La humanización se puede realizar esencialmente según el método de Winter y colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], mediante sustitución de las CDR o secuencias CDR de roedores por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Según esto, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de EE UU No. 4.816.567), en donde se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en los que algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

También se pueden producir anticuerpos humanos usando varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo librerías de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. También están disponibles las técnicas de Cole y col y de Boerner y col para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]. De forma similar, se puede hacer humano mediante la introducción de locus de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes endógenos de inmunoglobulinas se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la vista en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo reorganización de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este planteamiento se describe, por ejemplo, en las patentes de EE UU no. 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995).

Una vez que se han obtenido los anticuerpos, se puede probar su actividad inhibidora de metaloproteínas. Las condiciones de ensayo apropiadas para la actividad inhibidora de metaloproteínas se describen en Knight et al., *FEBS Letters* 296(3):263-266 (1992), Cawston et al., *Anal. Biochem.* 99:340-345 (1979), Cawston et al., *Methods in Enzymology* 80:771 et seq. (1981); Cawston et al., *Biochem. J.*, 195:159-165 (1981), Weingarten et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 139:1184-1187 (1984) y patentes de EE UU No. 4.743.587 y 5.240.958.

Usando la metodología descrita en el presente documento anteriormente, los presentes inventores fueron capaces de producir anticuerpos inhibidores de metaloproteasas de matriz (MMP) para MMP-2 y MMP-9.

Por tanto, se proporciona un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, que es capaz de inhibir la actividad de una MMP. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este aspecto incluye una región de reconocimiento del antígeno (región de unión al antígeno) que es capaz de unirse a una estructura que incluye un ión metálico unido de forma coordinada con un quelante del mismo.

Como se ilustra en la sección de ejemplos que sigue, los presentes inventores han mostrado concluyentemente que tal anticuerpo generado contra una estructura quelante-ión metálico presente en una MMP es capaz de inhibir específica y eficazmente la actividad de una forma activa de tal enzima.

Una metaloproteasa de matriz se refiere a una enzima que degrada tejidos conjuntivos y componentes de tejido conjuntivo y que incluye un dominio catalítico que tiene una secuencia quelante, tal como el motivo de unión a zinc mostrado en HEXXHXXGXXH y un ión de metal de transición tal como zinc.

La tabla 1 a continuación, enumera ciertas MMP de vertebrados, así como miembros de no vertebrados, que se han identificado en erizos de mar, *Caenorhabditis elegans*, soja y *Arabidopsis thaliana* y que se pueden usar como dianas para los potentes inhibidores de este aspecto descritos en el presente documento.

5

Tabla 1

Proteína	MMP
Colagenasa 1	MMP-1
Gelatinasa A	MMP-2
Estromelisina 1	MMP-3
Matrilisina	MMP-7
Colagenasa 2	MMP-8
Gelatinasa B	MMP-9
Estromelisina 2	MMP-10
Estromelisina 3	MMP-11
Elastasa de macrófagos	MMP-12
Colagenasa 3	MMP-13
MT1-MMP	MMP-14
MT2-MMP	MMP-15
MT3-MMP	MMP-16
MT4-MMP	MMP-17
Colagenasa 4 (<i>Xenopus</i>)	MMP-18
(Sin nombre trivial)	MMP-19
Enamelisina	MMP-20
XMMP	MMP-21
CMMP	MMP-22
(Sin nombre trivial)	MMP-23

10

Puesto que la secuencia quelante de MMP incluye residuos de histidina que son ligandos basados en imidazol como se ha descrito anteriormente, el quelante de metal utilizado para generar anticuerpos neutralizantes de MMP para su uso según las enseñanzas de la presente invención preferiblemente incluye al menos dos moléculas similares a porfirina, que son estructuras similares a imidazol.

15

En la técnica se conocen una variedad de porfirinas sintéticas. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a 5,10,15,20-tetra(4-piridil)porfirina, 5,10,15,20-tetra(4-piridil)porfirina, tetra(p-toluenosulfonato) de 5,10,15,20-tetrakis(1-metil-4-piridinio)porfirina, tetra(p-toluenosulfonato) de 5,10,15,20-tetrakis(4-trimetilamoniofenil)porfirina y 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil)porfirina. Tales porfirinas están comercialmente disponibles de Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com).

20

Los ejemplos de composiciones que se pueden usar para generar los anticuerpos inhibidores para su uso en la presente invención incluyen, pero no están limitados a, porfirinas "protegidas" [Almog, J., et al., *J. Am Chem.* 97:226-227 (1975); Almog, J., et al., *Tetrahedron* 37:3589-3601 (1981); Baldwin, J. E., et al., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* pp. 1739-1746 (1984)], porfirinas "en puente" [Battersby, A. R., et al., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* pp. 879-891 (1976); Battersby, A. R., et al., *Tetrahedron Lett.* 3169-3172 (1978)], porfirinas "de valla en estacas" [Coltman, J. P., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 95:7868-7870 (1973); Coltman, J. P., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 97:1427-1439 (1975)], porfirinas "en bolsillo" [Collman, J. P., et al., *Inorg. Chem.* 22:1427-1432 (1983)], porfirinas "en asa de cesta" [Mometeau, M., et al., *Nouv. J. Chim.* 3:77-99 (1979); Mometeau, M., et al., *J. Mol. Catal.* 7:315-320 (1980); Mometeau, M., et al., *J. Chem. Soc. Perkins Trans.* 1:189-196 (1983)], porfirinas "giroscopio" [Lecas, A., et al., *Tetrahedron Lett.* pp. 1019-1022 (1985); Boitrel, B., et al., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* pp. 1820 (1985)], porfirinas "ciclofano" [Diekmann, H., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 93:4068-4070 (1971); Traylor, T. G., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 107:604-614 (1985)] y porfirinas de tipo "medusa" [Uemori, Y., et al., *Inorg. Chem.* 28:1690-1694 (1989)].

30

Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, un uso específico para los anticuerpos descritos es la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con actividad desequilibrada o anormal de metaloproteínas tales como metaloproteasas, tal como, por ejemplo, se hace referencia en las reivindicaciones.

35

Ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no están limitadas a, enfermedades artríticas, tales como artrosis, artritis reumatoide (AR), artritis séptica, reumatismo de tejidos blandos, policondritis y tendinitis; tumores metastásicos, enfermedades periodontales; úlceras de la córnea, tal como la inducida por álcali u otras quemaduras, por radiación, por deficiencia en vitamina E o retinoide; enfermedades glomerulares, tales como proteinuria, epidermólisis bullosa distrófica; enfermedades de reabsorción de hueso, tales como osteoporosis, enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo y colesteatoma; anticoncepción a través de la prevención de la ovulación o implantación; angiogénesis relacionada con crecimiento tumoral o con la neovascularización asociada con retinopatía diabética y degeneración macular; trombosis coronaria asociada con ruptura de placas ateroscleróticas; enfisema pulmonar, cicatrización e infección por VIH.

40

Por tanto, se proporciona un método de inhibir la actividad de metaloproteasas de matriz en un sujeto en necesidad del mismo.

5 Los sujetos individuales preferidos según la presente invención son mamíferos tales como caninos, felinos, ovinos, porcinos, equinos, bovinos, seres humanos y similares.

10 El método incluye proporcionar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de MMP descrito en el presente documento (es decir, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, descritos anteriormente en el presente documento).

15 Como se detalla además en el presente documento posteriormente, el inhibidor de MMP se puede proporcionar mediante administración directa (por ejemplo, administración oral o inyección) o se puede expresar de una construcción polinucleotídica administrada a células diana del individuo.

20 Los inhibidores de MMP descritos en el presente documento se pueden proporcionar a un individuo por sí, o como parte de una composición farmacéutica donde se mezclan con un soporte farmacéuticamente aceptable.

25 Como se usa en el presente documento una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como soportes y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

30 En el presente documento el término "principio activo" se refiere a la preparación de anticuerpo, que es responsable para el efecto biológico.

35 De aquí en adelante, las frases "soporte fisiológicamente aceptable" y "soporte farmacéuticamente aceptable" que se pueden usar de forma intercambiable se refieren a un soporte o un diluyente que no produce irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. En estas frases se incluye un adyuvante. Uno de los ingredientes incluidos en el soporte farmacéuticamente aceptable puede ser por ejemplo, polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio intervalo de solubilidad en medios tanto orgánicos como acuosos (Mutter et al., (1979).

40 En el presente documento el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

45 Se pueden encontrar técnicas para la formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

50 Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, en especial transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramuscular, subcutánea e intramedular, así como inyecciones intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular.

55 De forma alternativa, se puede administrar una preparación de una forma local más que sistémica, por ejemplo mediante inyección de la preparación directamente en una región específica del cuerpo de un paciente.

60 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, preparación de grajeas, desleimiento, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

65 Las composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención se pueden formular de una manera convencional usando uno o más soportes fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

70 Para inyección, los principios activos descritos se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera que se va a penetrar. Tales penetrantes en general se conocen en la técnica.

75 Para la administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente mediante combinación de los principios activos con soportes farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales soportes permiten que los compuestos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grajeas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, mezclas no homogéneas, suspensiones, y similares, para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden hacer usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla

5 resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir los auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grajeas. Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, fécula de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tal como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

10 Los núcleos de grajeas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos adecuados o mezclas de solventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grajeas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de principios activos.

15 Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral, incluyen capsulas duras hechas de gelatina así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos mezclados con rellenos tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los principios activos se pueden disolver o resuspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deben estar en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

20 Para la administración bucal, la composición puede tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de una manera convencional.

25 Para la administración por inhalación nasal, los principios activos para su uso según la invención se administran de forma conveniente en forma de una presentación en aerosol de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad posológica se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un dispensador que contenga una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

30 Las preparaciones descritas en el presente documento se pueden formular para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en formas farmacéuticas unitarias, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis con opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

35 Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Además, se pueden preparar suspensiones de los principios activos como suspensiones de inyección oleaginosas o acuosas. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos tal como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

40 De forma alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, solución acuosa estéril sin pirógenos, antes de su uso.

45 La preparación de la presente invención también se puede formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases convencionales de supositorios tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

50 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en donde los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para alcanzar el fin deseado. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de principios activos eficaces para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de una enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se trata.

55 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la materia.

60 Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos in vitro. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales y tal información se puede usar para determinar de forma más exacta, dosis útiles en seres humanos.

Se pueden determinar la toxicidad y eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y en cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosis puede variar dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosis las puede elegir el médico individual en vista del estado del paciente. [Véase, por ejemplo, Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 p.1].

Dependiendo de la gravedad y capacidad de respuesta de la afección que se va a tratar, la dosis puede ser de una única o una pluralidad de administraciones, con el ciclo del tratamiento que dura desde varios días a varias semanas o hasta que se realiza la cura o se alcanza una disminución del estado de enfermedad.

La cantidad de una composición que se va a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se trata, la gravedad de la afección, el modo de administración, el juicio del médico que receta, etc.

También se pueden preparar composiciones que incluyen la preparación de la presente invención formulada en un soporte farmacéutico compatible, colocar en un envase adecuado y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada.

Las composiciones de la presente invención se pueden presentar, si se desea, en un envase o dispositivo dosificador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener uno o más formas farmacéuticas unitarias que contienen el principio activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una hoja metálica o de plástico, tal como un blíster. El envase o dispositivo dosificador puede estar acompañado por instrucciones para la administración. El envase o dispositivos dosificador también puede estar provisto de un aviso asociado con el envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de fármacos, aviso que refleja la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o administración humana o veterinaria. Tal aviso, por ejemplo, puede ser de etiqueta aprobación por la Agencia de Alimentos y Fármacos de los EE UU para fármacos con receta o una ficha técnica de producto aprobado.

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, los inhibidores anticuerpos de la presente invención se pueden expresar de una construcción de ácido nucleico.

Se apreciará que los polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la presente invención preferiblemente codifican además un péptido señal que permite la secreción o tráfico de los anticuerpos a una localización subcelular o extracelular de interés. Por ejemplo, cuando la metaloproteína diana es una MMP, preferiblemente se conjuga un péptido señal secretor en el mismo marco de lectura que el polinucleótido que codifica el segmento de anticuerpo.

Se apreciará además que los fragmentos Fv recombinantes de cadena única (scFv) se pueden expresar preferiblemente debido a su estructura considerablemente menos complicada comparada con las moléculas de anticuerpo entero. Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, los scFv son proteínas que consisten en las cadenas polipeptídicas de anticuerpo V_L y V_H sintetizadas como una única cadena con el extremo carboxilo de V_L unido por un puente peptídico al extremo amino de V_H. Los métodos para producir de forma recombinante estos péptidos se conocen bien en la técnica [véase, Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Huston et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); y de Kruif et al., J. Mol. Biol. 248:97-105 (1995)]. Según formas de realización de este aspecto de la presente invención, después de la inmunización con los compuestos de la presente invención, se recoge ARNm esplénico del animal inmunizado y se usa para producir una genoteca de ADNc en un bacteriófago que presenta los fragmentos scFv. Las partículas de fago se criban luego para determinar las que interaccionan específica y preferiblemente con la forma activada de la metaloproteína de interés. Los segmentos scFv se recuperan de estas partículas de fagos y se clonan en una construcción de expresión (véase la patente de EE UU No. 5.800.814).

Se pueden administrar construcciones de ácidos nucleicos a las células diana del sujeto individual (es decir, terapia génica *in vivo*).

De forma alternativa, la construcción de ácido nucleico se introduce en una célula adecuada mediante un vehículo/método de distribución génica adecuado (transfección, transducción, recombinación homóloga, etc.) y un sistema de expresión según sea necesario y después las células modificadas se expanden en cultivo y se devuelven al individuo (es decir, terapia génica *ex vivo*).

Para permitir la expresión celular de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos la construcción de ácido nucleico incluye además al menos un elemento regulador que actúa *in cis*. Como se usa en el presente documento, la frase "elemento regulador que actúa *in cis*" se refiere a una secuencia de polinucleótido, preferiblemente un promotor, que se une a un regulador que actúa *in trans* y regula la transcripción de una secuencia codificante localizada después de las mismas.

Se puede usar cualquier promotor disponible por la presente metodología. En una forma de realización preferida de la presente invención, el promotor utilizado por la construcción de ácido nucleico de la presente invención es activo en la población celular específica transformada. Los ejemplos de promotores específicos de tipo celular y/o específicos de tejido incluyen promotores tales como albúmina que es específico de hígado [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], promotores linfoides específicos [Calame et al.; (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]; en particular promotores de los receptores de células T [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji et al. (1983) Cell 33729-740], promotores específicos de neuronas tal como el promotor de neurofilamentos [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477], promotores específicos de páncreas [Etlunck et al. (1985) Science 230:912-916] o promotores específicos de glándula mamaria tal como el promotor de suero de leche (patente de EE UU No. 4.873.316 y publicación de solicitud europea No. 264.166). La construcción de ácido nucleico de la presente invención puede incluir además un potenciador, que puede estar adyacente o distante a la secuencia del promotor y puede funcionar aumentando la transcripción a partir del mismo.

Las construcciones de la presente metodología preferiblemente incluyen además un marcador de selección apropiado y/o un origen de replicación. Preferiblemente, la construcción utilizada es un vector lanzadera, que se puede propagar tanto en *E. coli* (en donde la construcción comprende un marcador de selección apropiado y un origen de replicación) como ser compatible para propagación en células, o integración en un gen y un tejido de elección. La construcción puede ser, por ejemplo, un plásmido, un bácmido, un fagémido, un cósmido, un fago, un virus o un cromosoma artificial.

Las técnicas de transferencia de ácidos nucleicos in vivo actualmente preferidas incluyen transfección con construcciones víricas o no víricas, tales como adenovirus, lentivirus, virus del herpes simple I o virus adenoasociados (AAV) y sistemas basados en lípidos. Lípidos útiles para la transferencia de genes mediada por lípidos son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Col [Tonkinson et al., Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996)]. Las construcciones más preferidas para su uso en terapia génica son virus, lo más preferiblemente adenovirus, AAV, lentivirus o retrovirus. Una construcción vírica tal como una construcción retrovírica incluye al menos un elemento transcripcional promotor/potenciador o que define un locus, u otros elementos que controlan la expresión génica por otros medios tales como ajuste alternativo, exportación nuclear del ARN o modificaciones postraduccionales del mensajero. Tales construcciones de vectores también incluyen una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (LTR) o partes de las mismas, y sitios de unión de cebadores a las hebras positiva y negativa apropiados para el virus usado, a menos que ya esté presente en la construcción vírica. Además, tal construcción típicamente incluye una secuencia señal para la secreción del péptido o anticuerpo de una célula huésped en la que se coloca. Preferiblemente la secuencia señal para este fin es una secuencia señal de mamífero. Opcionalmente, la construcción también puede incluir una señal que dirige la poliadenilación, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. A modo de ejemplo, tales construcciones incluirán típicamente una LTR 5', un sitio de unión de ARNt, una señal de empaquetamiento, un origen de síntesis de la segunda hebra de ADN y una LTR 3' o una parte de la misma. Se pueden usar otros vectores que no son víricos, tales como lípidos catiónicos, polilisina y dendrímeros.

Los modos preferidos para realizar los protocolos de terapia génica se proporcionan en Somia y Verma [(2000) Nature Reviews 1:91-99], Isner (2002) Myocardial gene therapy. Nature 415:234-239; High (2001) Gene therapy: a 2001 perspective. Haemophilia 7:23-27; y Hammond y McKirnan (2001) Angiogenic gene therapy for heart disease: a review of animal studies and clinical trials. 49:561-567.

Debido a la capacidad de los anticuerpos para su uso en la presente invención de reconocer diferencialmente la forma activada de la metaloproteína (véanse los ejemplos 5 y 6 de la sección de ejemplos), se pueden usar como potentes herramientas de diagnóstico y pronóstico, tal como mediante el seguimiento de la actividad MMP en una muestra biológica [es decir, cualquier muestra corporal tal como sangre (suero o plasma), esputo, fluido ascítico, efusiones pleurales, orina, muestras de biopsia, células aisladas y/o preparación de membrana celular]. Esto es de especial significancia cuando se evalúan las características metastásicas de células cancerosas, en donde la activación desequilibrada de las MMP facilita la invasión tumoral. Asimismo, los anticuerpos para su uso en la presente invención se pueden usar en el seguimiento de dosis terapéutica de inhibidores de MMP. Para tales aplicaciones los anticuerpos para su uso en la presente invención preferiblemente se marcan con cada uno de cualquier etiqueta o marcador radioactivo, fluorescente, biológico o enzimático de uso estándar la técnica. Las patentes de EE UU referidas al uso de tales marcadores incluyen las patentes de EE UU No. 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 y 4.366.241.

Se apreciará que tales métodos de detección también se pueden usar para el cribado de alto rendimiento de nuevas MMP. Brevemente, se pueden poner en contacto múltiples muestras biológicas con los anticuerpos de la presente invención, donde las MMP activadas se pueden unir a las mismas. Se toman medidas para usar muestras biológicas, que incluyen MMP activadas tales como las que derivan de líneas celulares tumorales. Típicamente, se usa un marcador radioactivo para reducir el volumen del ensayo.

De forma alternativa, los anticuerpos para su uso en la presente invención se pueden usar para purificar metaloenzimas activas de muestras biológicas.

En la técnica se conocen numerosos métodos de purificación de proteínas. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la presente invención se pueden usar en cromatografía de afinidad para aislar las metaloenzimas. Se pueden preparar columnas donde los anticuerpos se unen a un sustrato sólido, por ejemplo, partículas, tales como agarosa, Sephadex, y similares, y la muestra biológica, tal como un lisado celular, se puede pasar a través de la columna, lavar la columna seguido por aumentar las concentraciones de un desnaturizante moderado, mediante lo cual la metaloenzima purificada se liberará.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos generados según las enseñanzas descritas en el presente documento se pueden incluir en un kit diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden empaquetar en uno o más envases con tampones y conservantes adecuados y usar para el diagnóstico o para dirigir un tratamiento terapéutico.

Por tanto, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden mezclar cada uno en un envase único o colocar en envases individuales. Preferiblemente, los envases incluyen una ficha técnica. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas y tubos de ensayo. Los envases pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico.

Además, también se pueden añadir otros aditivos tales como estabilizantes, tampones, bloqueantes y similares. Los anticuerpos de tales kits también pueden estar unidos a un soporte sólido, tal como bolas, sustrato matriz (por ejemplo, chips) y similares y usarse para fines diagnósticos. El kit también puede incluir instrucciones para determinar si el sujeto ensayado padece, o tiene riesgo de desarrollar, una afección, trastorno o enfermedad asociada con la expresión de una MMP de interés.

En el presente documento también se describe un nuevo planteamiento para calificar la especificidad de anticuerpos hacia iones metálicos y quelantes de los mismos mediante la determinación de cambios conformacionales y/o cambios electrónicos en la unión del ión metálico al quelante del mismo después de la unión del anticuerpo.

La determinación de los cambios conformacionales y electrónicos en la unión del ión metálico al quelante del mismo después de la unión del anticuerpo según este aspecto de la presente invención se puede realizar mediante estudios de espectroscopía de absorción de rayos X (XAS). XAS se refiere a la estructura oscilatoria en el coeficiente de absorción de rayos X por encima de un límite de absorción de rayos X de un elemento diana. Esta estructura representa una firma única de un material determinado, que depende de la estructura atómica detallada, propiedades electrónicas y vibratorias del material. Un espectro característico de XAS consiste en el espectro de absorción de rayos X cerca del límite (XANES) y las regiones de estructura fina de absorción de rayos X extendida (EXAFS). El XANES incluye información acerca del estado de oxidación del ión metálico y su geometría y el análisis de la región EXAFS proporciona la estructura atómica alrededor de un ión metálico incluyendo las distancias medias de enlace, variación cuadrada media en distancia, números de coordinación y la identidad de los átomos alrededor del ión metálico.

Típicamente, el fin de los estudios de absorción de rayos X de proteínas ha sido la investigación del entorno atómico local en las pocas capas vecinas más próximas alrededor del elemento de interés. La sección transversal de absorción de rayos X medida en el intervalo de energía desde la energía en límite de absorción del elemento hasta aproximadamente 1000 eV pasado la misma proporciona la información sobre las propiedades tanto estructurales como electrónicas del absorbente. La EXAFS es una técnica valiosa para la elucidación estructural de una variedad de sitios metálicos en metaloproteínas (Scott, véase referencia anteriormente). La información estructural de alta resolución que se puede obtener mediante estudios de XAS lo hace una herramienta ventajosa para seguir la coordinación y electrónica de zinc del sitio activo en proteínas que se unen a metales tales como las MMP durante diferentes fases de los procesos de activación e inhibición (Kleifeld, anteriormente). Se apreciará que XAS es la única herramienta espectroscópica disponible hasta la fecha que pueda demostrar directamente el de otra manera espectroscópicamente silencioso ión de zinc. Se proporcionan detalles adicionales sobre EXAFS en Scott, R. A. (1985) *Methods in Enzymology*, 117.

Objetos adicionales, ventajas y características nuevas de la presente invención serán aparentes para el experto en la materia tras el examen de los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean limitantes. Además, cada una de las varias formas de realización y aspectos de la presente invención como se ha delineado en el presente documento anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones posteriormente encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitante.

En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual"

Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al., (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se explican en las patentes de EE UU Nos. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles están extensamente descritos en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE UU Nos. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en las mismas se conocen bien en la técnica y se proporcionan para conveniencia del lector.

Ejemplo 1

Preparación de anticuerpos monoclonales contra el sitio activo de MMP-2

Para la producción de un anticuerpo monoclonal específico contra las características electrónicas y físicas del sitio activo de MMP-2 se sintetizaron y usaron adicionalmente para la inmunización de ratones haptenos sintéticos (figura 3) con una estructura análoga al sitio activo de MMP-2, es decir, un ión de zinc coordinado con tres histidinas y una molécula de agua (Kleifeld et al., 2001).

Materiales y métodos experimentales

Síntesis de haptenos Co-TCPP y Zn-TCPP – Se sintetizaron los haptenos tetracarboxifenilporfirina Co(II) (Co-TCPP) y tetracarboxifenilporfirina Zn(II) (Zn-TCPP) como sigue: Se añadieron $\text{Co}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ o $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 63 mM en una solución que contenía metanol y ácido acético en concentraciones iguales a TCPP 6,3 mM. Las mezclas se calentaron durante 30 minutos a 60°C durante los cuales los solventes orgánicos se evaporaron. Los residuos se disolvieron en la misma solución de metanol/ácido acético y se purificaron usando una columna de gel de sílice [DC Scientific, Ohio Valee, Kelton, PA 19346, EE UU. Véase, Harada, A. et al, Photochemistry and Photobiology (1999) 70, 298-302]. Las fracciones purificadas se evaporaron adicionalmente y produjeron los haptenos Co-TCPP o Zn-TCPP como sedimentos marrón-púrpura o púrpura, respectivamente. La identidad de los sedimentos se confirmó adicionalmente usando espectrometría de masas.

Zimografía en gelatina – Para la zimografía de sustrato, se cargó una muestra de proteína purificada en un SDS-PAGE al 12% que contenía 0,5 mg/ml de gelatina. El ensayo de actividad se realizó como se ha descrito en otra parte (Gogly et al., 1998).

Conjugación de haptenos a proteínas soporte – Los haptenos Co-TCPP y Zn-TCPP (4,6 μmoles de cada uno) se disolvieron en 475 μl de dimetilformamida (DMF) y se activaron durante 1 hora a temperatura ambiente mediante 3,2 μmoles de carbonildiimidazol (CDI, Fluka, 21860, Sigma-Aldrich Israel Ltd. Rehovot, Israel). Los haptenos activados se añadieron a soluciones frías de 2,5 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA) o de 2,5 mg/ml de hemocianina de lapa californiana (KLH), ambos en NaHCO_3 0,1 M, pH 8. Los haptenos se agitaron durante 3 horas a 4°C y durante 1 hora adicional a temperatura ambiente. Los conjugados de haptenos se dializaron extensamente en una solución que contenía NaHCO_3 0,1 M, pH 8 y PBS 3x a una concentración molar de 0,5 mM y se diluyeron a una concentración final de 1 mg/ml y 0,6 mg/ml para Co-TCPP-BSA y Co-TCPP-KLH, respectivamente, y a una concentración final de 1 mg/ml tanto para Zn-TCPP-BSA como Zn-TCPP-KLH. Para la determinación de la densidad de haptenos (Hd) los conjugados de los haptenos se diluyeron (1:50) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se midió la absorbancia a 431 nm. Se calculó la densidad de hapteno por molécula soporte según la concentración molar estimada.

Inmunización de ratones contra los haptenos de TCPP – Se inmunizaron ratones mediante inyección en la almohadilla plantar de 50 μg de haptenos conjugados a KLH. Después de dos inyecciones de recuerdo en intervalos de dos semanas, se extrajo sangre del ojo de los ratones para evaluar el título del anticuerpo. Un mes después de la segunda inyección de recuerdo se dio una inyección en la vena de la cola (50 μg en PBS) y tres días después el bazo se fusionó con polietilenglicol (PEG) línea celular de mieloma para producir hibridomas. Los hibridomas se clonaron en placas de 96 pocillos y se cribaron contra conjugados de haptenos mediante ensayo inmunoabsorbente

(ELISA) esencialmente como se ha descrito en otra parte [Engvall E. y Pece A.J. (1978) Scand. J. Immunol. 8, Supl. 7].

Purificación de anticuerpos monoclonales – Se mezclaron muestras de ascitis con un volumen igual de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se centrifugaron durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. El precipitado se resuspendió en PBS, se incubó durante 1 hora y se dializó durante 4 horas. Los anticuerpos monoclonales se purificaron adicionalmente mediante una columna de proteína G Sepharosa (Farmacia 17-0618-01, Rehovot, Israel) según las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos purificados se dializaron de nuevo en la misma solución durante 4 horas y se determinó la concentración de anticuerpo mediante la absorción a 280 nm.

Resultados experimentales

La producción de anticuerpos monoclonales contra las características electrónicas y físicas de MMP-2 – Para producir anticuerpos específicos que reconozcan las características electrónicas y físicas del sitio catalítico de MMP-2 se sintetizaron haptenos sintéticos que corresponden al sitio catalítico activo. En estos haptenos, los átomos de cobalto (Co) o zinc (Zn) se unen a la molécula de tetracarboxifenilporfirina (Co-TCPP o Zn-TCPP, respectivamente) como se ilustra en la figura 3. Antes de la inmunización de ratones los haptenos se conjugaron a seroalbúmina bovina (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH).

Se inmunizaron dos grupos de ratones con Co-TCPP o Zn-TCPP, conjugados a KLH. Se midió el título del suero de sangre de ojo de ratones 7-10 días después de la segunda y tercera inyección de recuerdo. Mientras que los ratones inmunizados con el hapteno Co-TCPP mostraron un título en suero suficiente de 1:20.000, los ratones inmunizados con el hapteno Zn-TCPP mostraron un título muy bajo e insuficiente (no mostrado). Tres días después de la tercera inyección de recuerdo el bazo se retiró y se fusionó con células de mieloma. Se obtuvieron ciento veinte clones que secretaban anticuerpos.

Estos resultados demuestran que el hapteno Co-TCPP, pero no el hapteno Zn-TCPP, es estable y adecuado para la producción de anticuerpos. Estos resultados se podrían explicar por la desestabilización del enlace agua-zinc del hapteno Zn-TCPP *in vivo*.

Ejemplo 2

Identificación y clasificación de anticuerpos monoclonales

Se identificaron y clasificaron los anticuerpos monoclonales por su afinidad y competición a haptenos conjugados.

Materiales y métodos experimentales

Afinidad del anticuerpo monoclonal hacia haptenos conjugados – Se recubrieron placas de microtitulación (Maxi Immunoabsorp, Nunc, Rehovot, Israel) durante 1 hora con 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de conjugados de hapteno en PBS, se bloquearon durante 1 hora en BSA al 1%/PBS y se sometieron adicionalmente a una incubación de 1 hora con varias concentraciones de anticuerpos monoclonales. Las placas recubiertas se lavaron después tres veces en Tween-20 (Sigma, Rehovot, Israel) al 0,04% en PBS seguido por una incubación de 1 hora con un anticuerpo secundario de cabra anti ratón conjugado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Tel-Aviv, Israel). Las placas se lavaron luego otra vez con PBS y las reacciones de peroxidasa se desarrollaron en una solución que contenía ácido cítrico 0,028 M, Na_2HPO_4 0,044 M, ABTS (ácido 2,2,azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) 1 mg/ml y H_2O_2 al 30%.

Caracterización de subclases de anticuerpos – Se añadieron anticuerpos monoclonales (1 μg en 50 μl) a placas de microtitulación recubiertas con hapteno y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron después en PBS que contenía Tween-20 al 0,04% y se añadieron varios tipos de anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM) durante una incubación de 1 hora. Las placas con el anticuerpo unido se lavaron luego en PBS y las reacciones de peroxidasa se desarrollaron como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Resultados experimentales

Cribado de hibridomas – Los hibridomas aislados se cultivaron durante una semana. Se analizó después la capacidad de los medios condicionados de los hibridomas de unirse al antígeno hapteno unido a una fase sólida. Cincuenta hibridomas positivos (de 120) se analizaron adicionalmente para la capacidad del antígeno de inhibir la unión del anticuerpo al hapteno inmunizante conjugado a BSA. Este análisis produjo 17 hibridomas en los que se alcanzó una inhibición del 50% en una concentración de hapteno menor de 10^{-6} M (datos no mostrados).

Subclases de anticuerpos – Los hibridomas que secretan anticuerpos se clasificaron en subclases mediante unión a anticuerpos secundarios IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ o IgM. Trece de los 17 hibridomas se identificaron como anticuerpos monoclonales de los cuales uno era IgM y 12 eran IgG (no mostrado). Cuatro hibridomas monoclonales

con los valores menores para la inhibición del 50% (por ejemplo, menor de 10^{-7} M) se subclonaron adicionalmente y se probaron para la inhibición de MMP-2. Entre ellos el anticuerpo con el mejor efecto de inhibición (Co-TCPP13e11) se propagó como ascitis.

5 Estos resultados demuestran la producción de un anticuerpo monoclonal específico dirigido al hapteno Co-TCPP.

Ejemplo 3

Caracterización del anticuerpo monoclonal contra MMP-2

10 Para caracterizar adicionalmente el anticuerpo monoclonal contra Co-TCPP se realizaron ensayos competitivos con competidores haptenos y ensayos de inmunoprecipitación.

Materiales y métodos experimentales

15 **Ensayo competitivo** – Los anticuerpos monoclonales (a una concentración de unión del 50%) se incubaron durante 1 hora con los competidores haptenos TCPP, Co-TCPP, Zn-TCPP, Zn-TPP y después se transfirieron a placas de microtitulación recubiertas con haptenos como se ha descrito en el ejemplo 2 anteriormente. Se determinó la constante de disociación requerida para obtener el 50% de unión.

20 **Inmunoprecipitación** – Se lavaron bolas de proteína A Pharmacia, Rehovot, Israel, en PBS según las instrucciones del fabricante. Se añadieron diez μg de anticuerpo monoclonal en 300 μl de PBS a ~ 30 μl de bolas de proteína A lavadas y se incubó durante la noche a 4°C . Los anticuerpos unidos a proteína A se lavaron después tres veces en PBS y se incubaron adicionalmente durante 3 horas a temperatura ambiente con 1 μg de dominio catalítico de MMP-2 [MegaPharm (Oncogene Research Products), Hod-Hasharon, Israel, número de catálogo PF023] con agitación continua. Después de la incubación la mezcla se centrifugó durante 2 minutos a 3000 rpm y las fases del precipitado y sobrenadante se analizaron en un gel de SDS-PAGE al 12%.

25 **Ensayos cinéticos usando un sustrato fluorogénico** – Se midió el efecto inhibitorio de los anticuerpos de la presente invención sobre la hidrólisis del sustrato fluorogénico Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ (sintetizado en el laboratorio del profesor Fridkin en el Instituto Weizmann) por la proteína del dominio catalítico de MMP-2 como se ha descrito anteriormente (Netzel-Arnett et al., 1991). Brevemente, se añadieron muestras de MMP-2 (200 nM) al sustrato fluorogénico en un intervalo de concentración de 0,4-50 μM en un volumen final de 200 μL . La reacción se realizó a 37°C y la actividad de la enzima se controló cada 8 segundos durante 30 minutos midiendo la intensidad de fluorescencia (emisión a 390 nm, excitación a 340 nm) usando un aparato ESPECTRAFluor Plus (TECAN, Pharatop, Tel-Aviv, Israel). Se calculó la V_i para cada concentración de sustrato mediante la parte lineal de cada curva cinética y se calcularon los parámetros cinéticos (K_M y V_{MAX}) del gráfico de Lineweaver-Burk.

Resultados experimentales

30 **La afinidad del anticuerpo monoclonal hacia el hapteno Co-TCPP** – Se caracterizó el anticuerpo monoclonal Co-TCPP13e11 mediante su afinidad hacia el hapteno inmunizante Co-TCPP. Se añadieron diluciones en serie del anticuerpo purificado a placas de microtitulación recubiertas con Co-TCPP. Se calculó el valor de CI_{50} , que corresponde a la dilución de anticuerpo requerida para una unión del 50%, a partir de la curva de titulación (figura 4) y se determinó que era ~ 20.000 .

35 **El ensayo competitivo reveló especificidad de anticuerpo hacia el hapteno inmunizante** – Para determinar si el anticuerpo se une específicamente al hapteno inmunizante, el anticuerpo monoclonal se incubó con Co-TCPP, Zn-TCPP, TCPP y Zn-TPP y se representaron curvas de titulación contra concentraciones de hapteno (figura 5). Las constantes de disociación, es decir, la concentración que produce una unión del 50% del anticuerpo al hapteno, fueron 9×10^{-8} M, 1×10^{-5} M, 2×10^{-5} M y 3×10^{-5} M para Co-TCPP, Zn-TCPP, TCPP y Zn-TPP, respectivamente. Estos valores demuestran la alta especificidad del anticuerpo hacia el hapteno inmunizante (Co-TCPP).

40 **Inhibición específica de la actividad MMP-2 y MMP-9 por el anticuerpo monoclonal** – Para determinar si el anticuerpo monoclonal Co-TCPP13e11 puede inhibir específicamente las proteínas MMP, se midió la hidrólisis del sustrato fluorogénico en presencia del anticuerpo. Los parámetros cinéticos del ensayo de inhibición (es decir, K_i) fueron 24 μM y 13 μM para el dominio catalítico de MMP-2 y la enzima de longitud completa MMP-9, respectivamente. De forma interesante, a todas las concentraciones de anticuerpo las curvas de Lineweaver-Burk mostraron un punto de intersección único y común en el eje Y (Figuras 6a-b). Estos resultados sugieren que el anticuerpo monoclonal inhibía las enzimas MMP-2 y MMP-9 de una forma competitiva.

45 La selectividad del anticuerpo monoclonal hacia las MMP se examinó adicionalmente probando su efecto inhibitorio sobre una enzima dependiente de zinc diferente, la alcohol deshidrogenasa de *Thermoanaerobacter brockii* (TbADH). Esta enzima cataliza la oxidación reversible de alcoholes secundarios a las correspondientes cetonas usando NADP^+ como cofactor (Korkhin et al., 1998). El zinc catalítico en TbADH está coordinado con histidina,

cisteína, aspartato y glutamato en una configuración de tetraedro. La incubación del anticuerpo monoclonal con TbADH no afectó la actividad enzimática (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren además que el anticuerpo monoclonal reconoce los residuos proteicos de histidina basados en imidazol expuestos, que están coordinados al ión de zinc catalítico en las MMP (Morgunova et al., 1999; Kleifeld et al., 2000) y no necesariamente al ión de zinc mismo.

Los análisis de inmunoprecipitación (IP) con el anticuerpo monoclonal revelaron alta especificidad hacia el dominio catalítico de MMP-2 – Para verificar adicionalmente que el anticuerpo monoclonal inhibía la actividad de varias MMP interactuando directamente con su sitio catalítico, se realizaron una serie de experimentos basados en inmunoprecipitación (IP). Brevemente, el anticuerpo monoclonal se asoció con bolas de proteína A y se añadió la enzima dominio catalítico de MMP-2 durante tres horas de incubación. Después de centrifugar se analizaron la fase que contenía las bolas (es decir, el precipitado) y la fase sin bolas (es decir, la soluble) en un gel de SDS-PAGE. Cuando el dominio catalítico de MMP-2 se incubó con bolas de proteína A sin anticuerpo la MMP-2 estaba contenida en la fase soluble (figura 7a, carril 1) pero no en la fase del precipitado (figura 7a, carril 2). Además, cuando el anticuerpo monoclonal se incubó con bolas de proteína A el anticuerpo estaba incluido en la fase del precipitado (figura 10a, carril 4) pero no en la fase soluble (figura 10a, carril 3). Estos resultados eliminaban la posibilidad de una asociación directa entre la enzima MMP-2 y las bolas de proteína A. Por otra parte, la enzima MMP-2 se encontró en la fase del precipitado cuando se incubó con bolas de proteína A preasociadas con el anticuerpo (figura 7a, carriles 5 y 6). Para eliminar la posibilidad de que la enzima y el anticuerpo se asocien para formar agregados directamente se coincubaron en ausencia de bolas de proteína A. Como se muestra en la figura 7a (carril 9) la fase soluble contenía tanto el anticuerpo como la enzima. Para estudiar adicionalmente la especificidad del anticuerpo hacia MMP-2, se incubaron las bolas unidas al anticuerpo preasociado con la proteína no relevante ARN-helicasa de caja DEAD A (DbpA). No se observó unión específica en la fase del precipitado (figura 7a, carriles 7 y 8) lo que indica falta de interacción específica entre el anticuerpo y DbpA. Se obtuvieron resultados similares con otras proteínas no relevantes (por ejemplo, el dominio citoplásmico C-terminal de gliotactina, datos no mostrados).

En conjunto, estos resultados demuestran que el anticuerpo monoclonal se une al dominio catalítico de MMP-2 de una manera muy específica y forma un complejo estable.

El ión de zinc es necesario para la unión del anticuerpo – Se queló el ión de zinc del dominio catalítico de MMP-2 usando orto-fenantrolina [Maret W., Makinen, M.W., JBC, 266, 20636-44 (1991)] y la enzima se incubó adicionalmente con bolas de proteína A preasociadas con anticuerpo. Como se muestra en la figura 7b (carriles 1 y 2) el anticuerpo monoclonal no se unió al dominio catalítico de MMP-2 sin zinc. Estos resultados demuestran que el ión de zinc en la enzima es crítico para la unión del anticuerpo. Además, la incubación del complejo anticuerpo-MMP-2 con el inhibidor de alta afinidad de MMP basado en hidroxamato, GM-6001 (Bendeck et al., 1996), no afectó la integridad del complejo (figura 7c). Estos resultados sugieren adicionalmente que el anticuerpo forma un complejo estrecho e irreversible con el sitio activo de la enzima MMP-2.

En conjunto, estos resultados demuestran que el anticuerpo monoclonal contra Co-TCPP puede inhibir específicamente el sitio activo de MMP-2. Además, estos resultados sugieren que el anticuerpo inicialmente reconoce los ligandos de zinc de histidina basado en imidazol en el sitio catalítico de MMP, y después se une al átomo metálico catalítico.

Ejemplo 4

Estudios de espectroscopía de absorción de rayos X (XAS)

XAS se refiere a la estructura oscilatoria en el coeficiente de absorción de rayos X por encima de un límite de absorción de rayos X de un elemento diana. Esta estructura representa una firma única de un material determinado, que depende en la estructura atómica detallada, propiedades electrónicas y vibracionales del material. Un espectro XAS característico consiste en el espectro de absorción de rayos X cerca del límite (XANES) y las regiones de la estructura fina de absorción de rayos X extendida (EXAFS). El XANES incluye información sobre el estado de oxidación del ión metálico y su geometría y el análisis de la región EXAFS proporciona la estructura atómica alrededor de ión metálico determinado incluyendo las distancias de enlace medias, la variación cuadrada media en distancia, números de coordinación y la identidad de los átomos alrededor del ión metálico.

Materiales y métodos experimentales

Preparación de muestras para estudios de XAS – Se activó pro-MMP-2 (Fridman et al., 1992; obtenida del Prof. R. Fridman, Wayne State University, Detroit, EE UU) mediante acetato 4-aminofenilmercúrico (APMA) como se ha descrito en otra parte (Kleifeld et al., 2001). La enzima y el anticuerpo monoclonal se concentraron por ultrafiltración usando un dispositivo Centricon-10 de Millipore (Bedford, MA, EE UU) hasta una concentración final de 0,1 mM y 0,2 mM, respectivamente. Las muestras se cargaron en soportes de muestra de cobre (10 X 5 X 0,5 mm hechos en la unidad del servicio técnico en el Instituto Weizmann) recubiertos con cinta Mylar y se congelaron inmediatamente en

nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se montaron dentro de un criostato de helio de ciclo cerrado Displex (Brookhaven Laboratories, Nueva York, EE UU).

5 **Recogida, procesamiento y análisis de datos de XAS** – Los estudios de XAS se realizaron como se ha descrito anteriormente (Kleinfeld et al., 2001). Brevemente, la intensidad del haz incidente, I_0 , se registró usando una cámara de ionización (Brookhaven Laboratories, Nueva York, EE UU) y la intensidad de fluorescencia, I_F , se registró usando un detector de 13-elemento germanio (Crambera, California, EE UU).

10 **Ajuste de EXAFS** – Se construyeron datos modelo para el procedimiento de ajuste mediante extracción de las coordenadas de sitio catalítico de zinc (en un radio de 5 Å) de la estructura de una molécula pequeña, WABKIT, que contiene un ion de zinc coordinado a tres histidinas, un oxígeno y un azufre, obtenido del banco de datos de proteína (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>). Las amplitudes de dispersión teóricas de fotoelectrones y los cambios de fase se calcularon usando el código informático FEFF7 (Rehr et al., 1991; Zabinsky et al., 1995). La señal teórica de XAFS se ajustó a los datos experimentales usando el método de ajuste no lineal de mínimos cuadrados, implementado en el programa FEFFIT (Stern et al., 1995).

Resultados experimentales

20 **La estructura del sitio catalítico de MMP-2 cambia tras la unión de los anticuerpos monoclonales** – Se estudió la estructura local del ión de zinc catalítico en la enzima MMP-2 humana recombinante de longitud completa en sus estados latente (es decir, pro-enzima), activo, e inhibido por anticuerpo monoclonal usando XAS. El espectro límite de la proenzima mostró tres picos distintos a 9668, 9713 y 9738 electronvoltios (eV) y una hendidura típica a 9725 eV. La activación de MMP-2 produjo un ligero aumento en la intensidad del pico a 9668 eV. Por otra parte, la inhibición de MMP-2 por el anticuerpo monoclonal produjo un pico mayor a 9668 eV, un pico adicional a 9680 eV (figura 8a, flecha 1) y la ausencia de hendidura evidente a 9730 eV (figura 8a, flecha 2). Además, se observa un cambio claro de 0,86 eV a mayor energía entre la enzima activa y la inhibida (figura 8b). Estas diferencias espectrales en XANES demuestran cambios conformacionales locales en el átomo metálico del sitio activo de MMP-2 tras la unión del anticuerpo.

30 **Análisis de ajuste del sitio activo de MMP-2** – Para elucidar adicionalmente los cambios conformacionales que se producen en el sitio activo después de la unión del anticuerpo se realizó un análisis de ajuste de EXAFS. La figura 9 demuestra los resultados del ajuste de los datos experimentales a la teoría. Los datos se presentan como la distribución radial desde el absorbente principal (el ión de zinc) y las capas de coordinación más próximas. La magnitud T.F. indica las intensidades de los picos en números arbitrarios. Estos resultados son consistentes con la pentacoordinación del ión de zinc con tres Zn-N a 2,07 Å, un Zn-S a 2,49 Å y un Zn-O o Zn-N a 1,96 Å y demuestra además que el anticuerpo se une directamente al ión de zinc catalítico a través de un ligando Zn-S y uno Zn-O o Zn-N.

En conjunto estos resultados demuestran que el anticuerpo monoclonal se une al ión de zinc catalítico.

40

Ejemplo 5

Ensayos complementarios apoyan los resultados de EXAFS

45 Para determinar si el anticuerpo se puede eliminar del sitio catalítico de MMP-2 mediante el corte del enlace Zn-S (Van Wart y Birkedal-Hansen, 1990) el complejo anticuerpo-MMP-2 se incubó con APMA.

Resultados experimentales

50 **La asociación anticuerpo-MMP-2 es relativamente estable** – El complejo anticuerpo-MMP-2 se sometió a tratamiento con APMA como se ha descrito anteriormente (Kleinfeld et al., 2001) y las fases soluble y del precipitado se analizaron adicionalmente mediante IP en un gel de SDS-PAGE. Como se muestra en la figura 10, solo una pequeña parte de la enzima MMP-2 se liberó del complejo anticuerpo-enzima.

55 Estos resultados demuestran una accesibilidad relativamente baja del reactivo APMA al sitio catalítico de la enzima debido a la protección del anticuerpo.

Ejemplo 6

60 **El anticuerpo monoclonal anti-MMP-2 bloquea la proteólisis pericelular de células de fibrocarcinoma muy invasivas**

Se ensayó la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-MMP-2 de la presente invención para inhibir la actividad proteolítica pericelular generada por células cancerosas de fibrocarcinoma muy invasivas (HT1080) mediante ensayo de zimografía in situ.

65

Materiales y procedimientos experimentales

Células, tampones y condiciones de crecimiento – Las células HT1080 se obtuvieron de la colección americana de cultivos tipo (ATCC, número de catálogo CRL-12011). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con L-glutamina 4 mM ajustado para contener bicarbonato de sodio 1,5 g/L y glucosa 4,5 g/L y suplementado con aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 90%; suero bovino fetal al 10% a 37°C.

Ensayo de zimografía in situ – Se embebieron HT1080 en matrigel fluorescente completamente conjugado y el ensayo de zimografía in situ se realizó esencialmente como han descrito Wang et al. Comp Hepatol. 14 de Enero de 2004; 3 Supl 1:S20; y Nakada Am J Pathol. Feb 1999; 154(2):417-28.

Resultados experimentales

Las células HT1080 sirven como un buen modelo para invasión de matriz ya que contienen MT1-MMP, MMP-2, MMP-9 y TIMP. Las células se incubaron en presencia (figura 11b) o ausencia (figura 11a) del anticuerpo monoclonal anti-MMP-2 descrito anteriormente, se tiñeron con DAPI y se sometieron a un ensayo de zimografía in situ. Como se muestra claramente en las figuras 11a-b, en ausencia del anticuerpo anti-MMP-2 (figura 11a), la proteólisis celular de MMP aparece como intensidad verde alrededor de la membrana celular. Sin embargo, tras la adición del anticuerpo, este patrón desapareció, lo que demuestra que el Acm inhibe la actividad proteolítica de las MMP generadas de estas células cancerosas muy invasivas con una K_i de 1 μ M. Por tanto, estos resultados sugieren que el Acm se une e inhibe las MMP activas en el espacio pericelular.

Se aprecia que ciertas características de la invención que, por claridad, se describen en el contexto de formas de realización separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una única forma de realización. A la inversa, varias características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una única forma de realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Aunque la invención se ha descrito junto con formas de realización específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán aparentes para los expertos en la materia.

Lista de referencias

(En el texto se citan referencias adicionales)

1. Nagase, H. y Woessner, J.F.Jr. (1999). Matrix metalloproteasas. Minireview. J. Biol. Chem. 274: 21491-21494.
2. Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Nagase, H. y Maskos, K. (1999). Endoproteinase-protein inhibitor interactions. APMIS 107, 3-10.
3. Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H. y Maskos, K. (1999). Structural properties of matrix metalloproteinases. Cell. Mol. Life. Sci. 55, 639-652.
4. Borkakoti, N. (1998). Matrix metalloproteases: variations on a theme. Prog. Biophys. Mol. Biol. 70, 73-94.
5. Brown, S., Bernardo, M.M., Li, Z.H., Kotra, L.P., Tanaka, Y., Fridman, R. y Mobashery, S. (2000). Potent and Selective Mechanism-Based Inhibition of Gelatinases. J. Am. Chem. Soc., 122, 6799 -6800.
6. Fridman, R., Fuerst, T.R., Bird, R.E., Hoyhtya, M., Oelkuct, M., Kraus, S., Komarek, D., Liotta, L.A., Berman, M.L. y Stetler-Stevenson, W.G. (1992). Domain structure of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. Characterization of proteolytic activity and identification of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binding regions. J Biol. Chem. 267, 15398-405.
7. Gogly, B., Groult, N., Hornebeck, W., Godeau, G. y Pellat, B. (1998). Collagen Zymography as a Sensitive and Specific Technique for the Determination of Subpicogram Levels of Interstitial Collagenase. Anal. Biochem. 255, 211-216.
8. Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H. y Thorgeirsson, U.P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur. J. Cell. Biol. 74, 111-122.
9. Henriet, P., Blavier, L. y Declerck, Y.A. (1999). Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. APMIS 107; 111-119.

10. Kleinfeld, O., Kotra, L.P., Gervasi, D.C., Brown, S., Bernardo, M.M., Fridman, R., Mobashery, S. y Sagi, I. (2001). X-ray Absorption Studies of Human Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) Bound to a Highly Selective Mechanism-based Inhibitor. Comparison with the latent and active forms of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 276, 17125-17131.
- 5 11. Korkhin, Y., Kalb(Gilboa), A.J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y. y Frolow, F. (1998). NADP-dependent Bacterial Alcohol Dehydrogenases: Crystal Structure, Cofactor-binding and Cofactor Specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. *J. Mol. Biol.* 278, 967-981.
- 10 12. Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U., Isupov, M., Lindqvist, Y., Schneider, G. y Tryggvason, K. (1999). Structure of Human Pro-Matrix Metalloproteinase-2: Activation Mechanism Revealed. *Science* 284, 1667-1670.
13. Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H. y Maskos, K. (1999). Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell. Mol. Life. Sci.* 55, 639-652.
- 15 14. Netzel-Arnett, S., Mallya, S.K., Nagase, H., Birkedal-Hansen, H. y Van Wart, H.E. (1991). Continuously recording fluorescent assays optimized for five human matrix metalloproteinases. *Anal. Biochem.* 195, 86-92.
15. Rehr, J.J., Mustre de Leon, J., Zabinsky, S.I. y Albers, R.C. (1991). *J. Am. Chem. Soc. USA* 113, 5135-5138.
- 20 16. Reponen, P., Sahlberg, C., Huhtala, P., Hurskainen, T., Thesleff, I. y Tryggvason, K. (1992). Molecular cloning of murine 72-kDa type IV collagenase and its expression during mouse development. *J. Biol. Chem.* 267, 7856-7862.
17. Stern, E.A., Newville, M., Ravel, B., Yacoby, Y. y Haskel, D. (1995). The UWXAFS analysis package: philosophy and details. *Physica B* 208/209, 117-122.
- 25 18. Van Wart, H. y Birkedal-Hansen, H. (1990). The Cysteine Switch: A Principle of Regulation of Metalloproteinase Activity with Potential Applicability to the Entire Matrix Metalloproteinase Gene Family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5578-5582.
- 30 19. Will, H., Atkinson, S.J., Butler, G.S., Smith, B. y Murphy G. (1996). The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. *J. Biol. Chem.* 271, 17119-17123.
- 35 20. Zabinsky, S.I., Rehr, J.J., Ankudinov, A., Albers, R.C. y Eller, M. J. (1995). Multiple-scattering calculations of x-ray-absorption spectra. *Phys. Rev. B* 52, 2995-3009.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo para su uso en el tratamiento de un cáncer metastásico, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región de reconocimiento del antígeno capaz de unirse tanto al ión metálico como a los aminoácidos de coordinación en el sitio de zinc catalítico de una metaloenzima, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo inhibe la actividad de MMP-2 y MMP-9.
- 10 2. Uso de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer metastásico, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región de reconocimiento del antígeno capaz de unirse tanto al ión metálico como a los aminoácidos de coordinación en el sitio de zinc catalítico de una metaloenzima, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo inhibe la actividad de MMP-2 y MMP-9.
- 15 3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 o el uso según la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 o el uso según la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

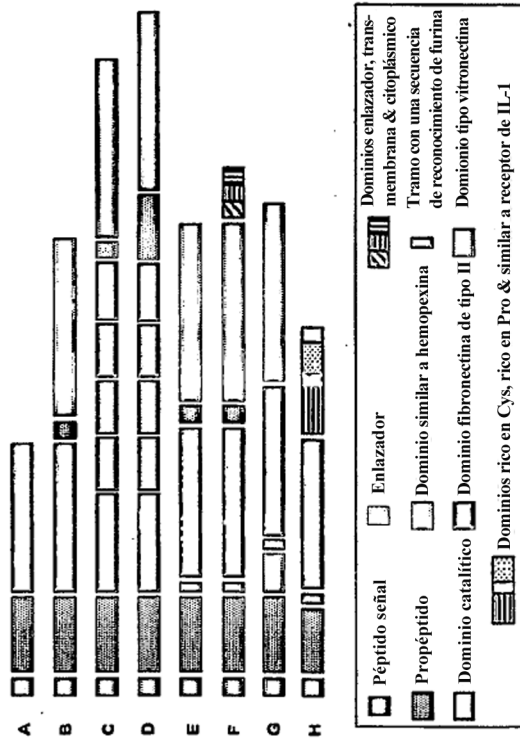


Fig. 1

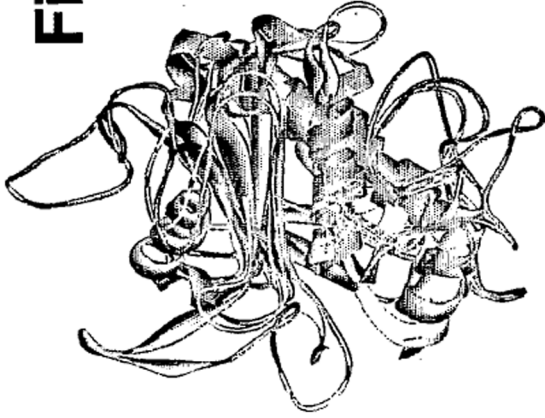


Fig. 2b

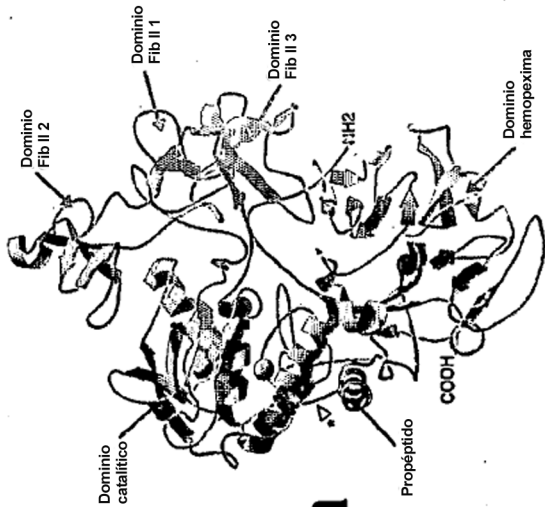


Fig. 2a

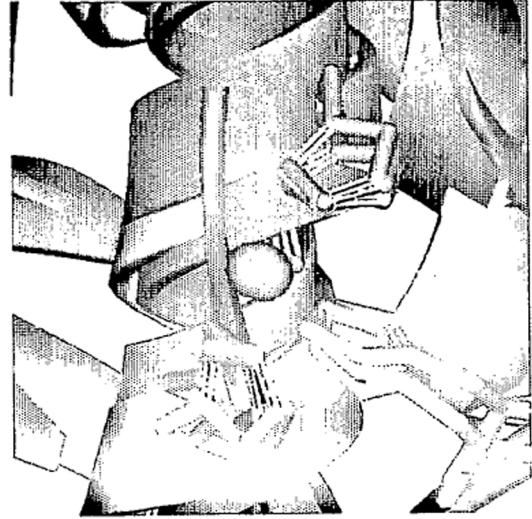


Fig. 2c

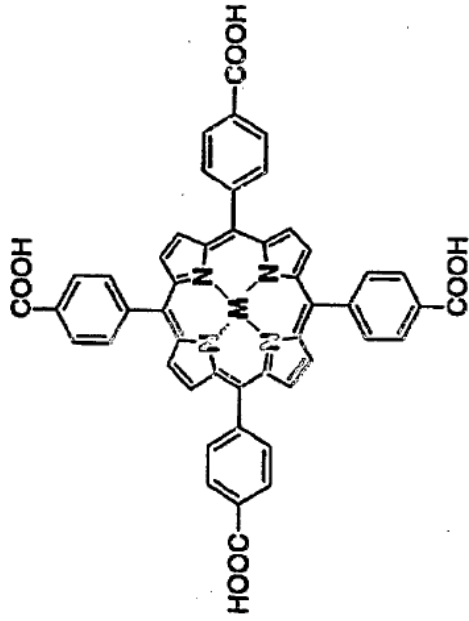


Fig. 3

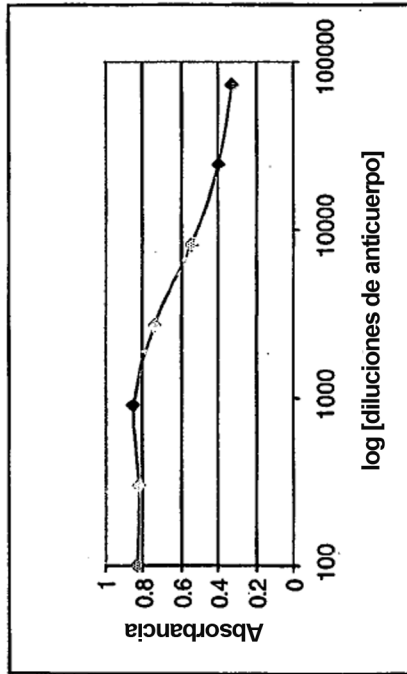


Fig. 4

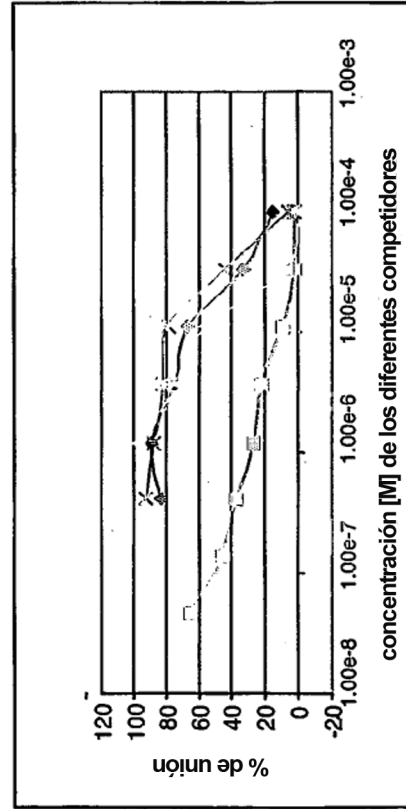


Fig. 5

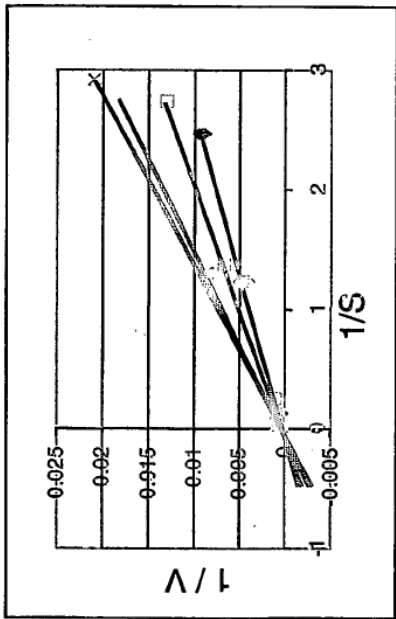


Fig. 6a

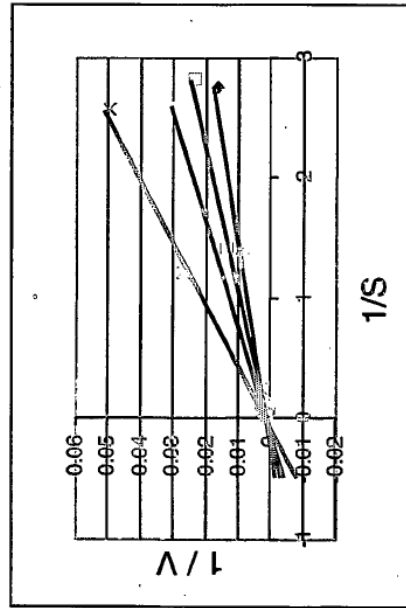


Fig. 6b

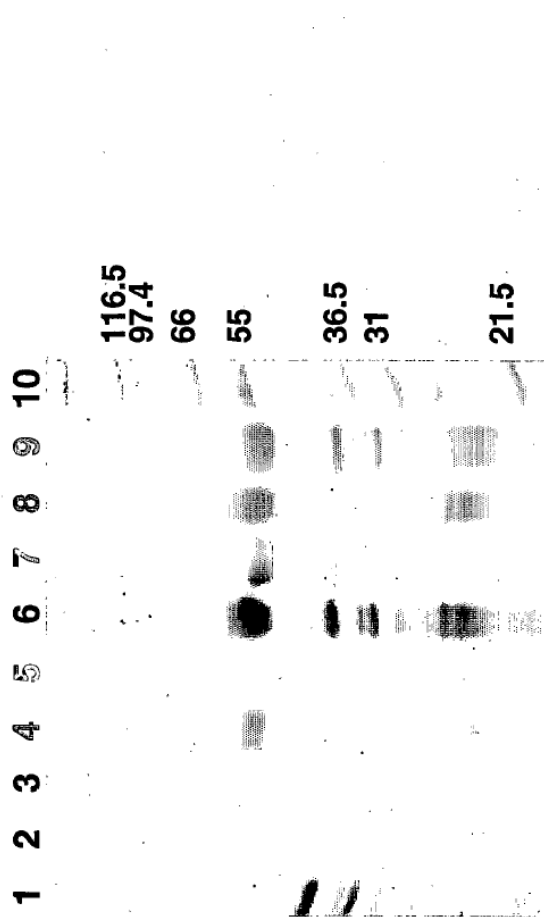


Fig. 7a

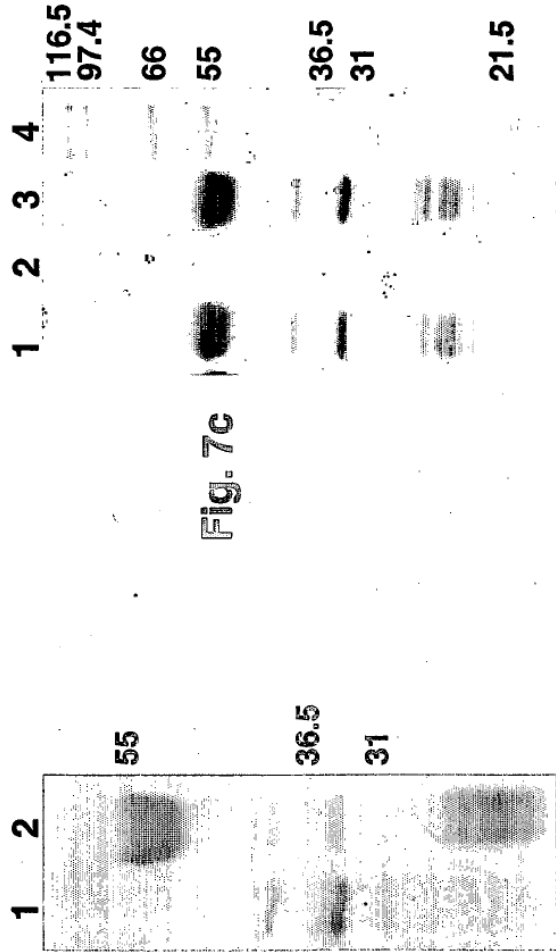


Fig. 7c

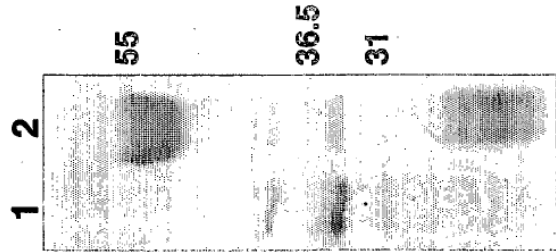


Fig. 7b

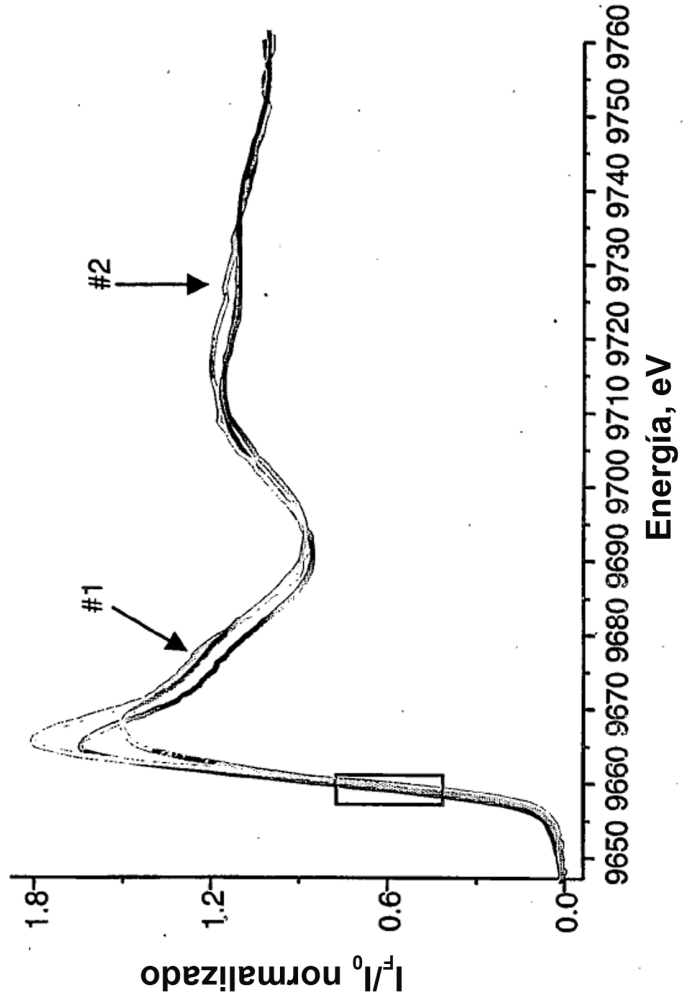


Fig. 8a

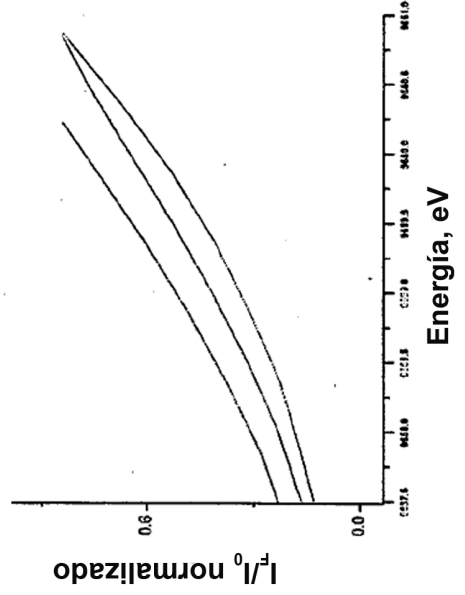


Fig. 8b

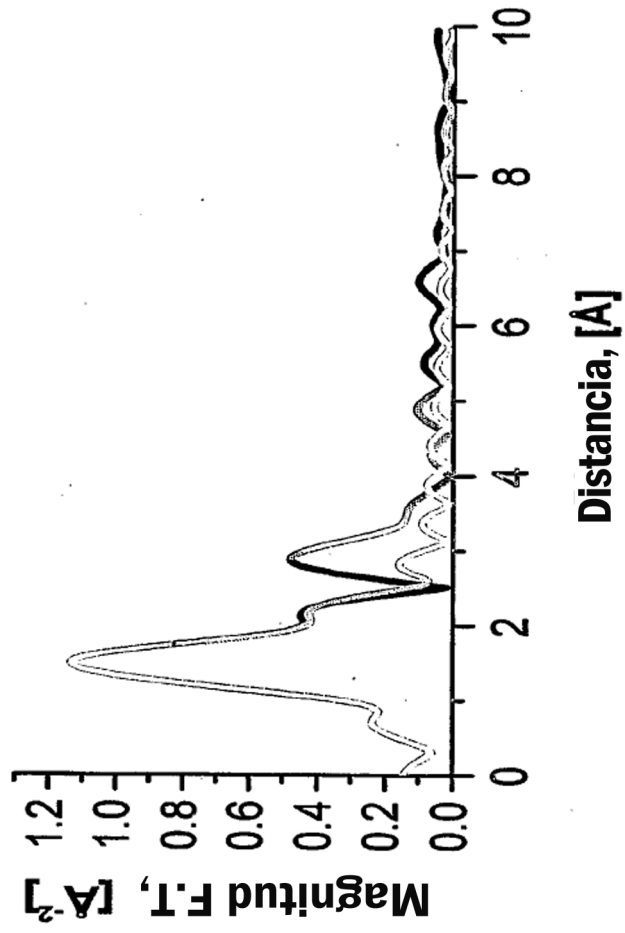


Fig. 9

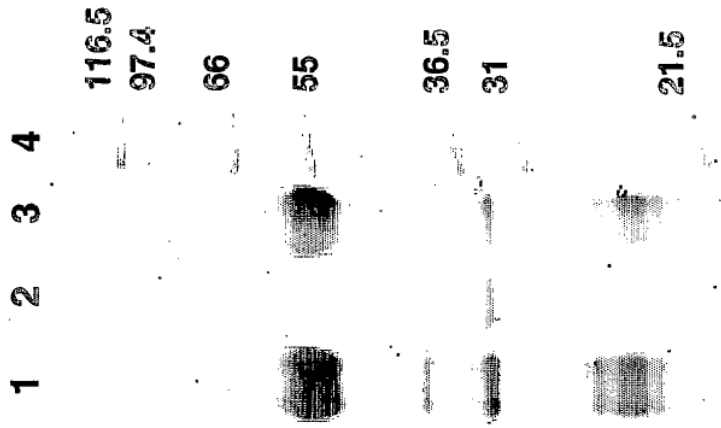


Fig. 10

Figs. 11a-b

B.

A.

