

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 080**

51 Int. Cl.:
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 5/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09010789 .7**
96 Fecha de presentación: **14.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **2135881**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.12.2009**

54 Título: **ANTICUERPOS QUE SE UNEN AL ANTÍGENO TAT10772 ASOCIADO A TUMORES PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE UN TUMOR.**

30 Prioridad:
20.06.2005 US 692092 P
21.04.2006 US 793951 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.01.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:
Dennis, Mark;
Mallet, William y
Polakis, Paul

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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).

ES 2 373 080 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que se unen al antígeno TAT10772 asociado a tumores para el diagnóstico y tratamiento de un tumor

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente memoria se refiere a composiciones de materia útil para el diagnóstico y tratamiento de un tumor en mamíferos y a métodos de utilización de estas composiciones de materia para los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Los tumores malignos (cáncer) son la segunda causa de muerte en los Estados Unidos, después de las enfermedades del corazón (Boring et al., CA Cancer J Clin., 43:7 [(1993)]. El cáncer se caracteriza por el incremento en el número de células anormales, o neoplásicas, derivadas de un tejido normal que proliferan para formar una masa tumoral, la invasión de tejidos adyacentes por estas células tumorales neoplásicas, y la generación de células malignas que finalmente se extienden a través de la sangre o el sistema linfático hasta nódulos linfáticos regionales y hasta puntos distantes a través de un proceso llamado metástasis. En un estado canceroso, una célula prolifera bajo condiciones en las que no crecerían células normales. El cáncer se manifiesta en una gran variedad de formas, caracterizadas por diferentes grados de invasión y agresividad.

[0003] En los intentos por descubrir dianas celulares eficaces para el diagnóstico y la terapia contra el cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana u otros polipéptidos asociados a membranas que se expresan específicamente en la superficie de uno o más tipos particulares de células cancerosas en comparación con una o más células no cancerosas normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados a membrana se expresan de manera más abundante en la superficie de las células cancerosas en comparación con la superficie de las células no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos antígenos de la superficie celular asociados a tumores ha proporcionado la capacidad de reconocer específicamente células cancerosas para la destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos. En este aspecto, cabe indicar que la terapia basada en anticuerpos se ha demostrado muy eficaz en el tratamiento de ciertos cánceres. Por ejemplo, HERCEPTIN® y RITUXAN® (ambas de Genentech Inc, South San Francisco, California) son anticuerpos que se han utilizado satisfactoriamente para tratar el cáncer de mama y el linfoma de no Hodgkin, respectivamente. Más específicamente, HERCEPTIN® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular del protooncogén del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Se observa la sobreexpresión de la proteína HER2 en el 25-30% de cánceres de mama primarios. RITUXAN® es un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales y malignos. Estos anticuerpos se producen recombinantemente en células CHO.

[0004] A pesar de los avances identificados anteriormente en la terapia del cáncer de mamífero, existe una gran necesidad para agentes de diagnóstico y terapéuticos adicionales capaces de detectar la presencia de un tumor en un mamífero y para inhibir de manera eficaz el crecimiento de células neoplásicas, respectivamente. Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es identificar: (1) polipéptidos asociados a la membrana celular que se expresan de manera más abundante en uno o más tipos de células cancerosas en comparación con células normales o en otras células cancerosas diferentes, y utilizar estos polipéptidos, y sus ácidos nucleicos codificantes, para producir composiciones de materia útiles en el tratamiento terapéutico y la detección diagnóstica de cáncer en mamíferos

[0005] WO 2004/035537 describe secuencias completas y parciales de CA125 (TAT 10772) y anticuerpos par las mismas.

[0006] Sweet et al., Gynecologic Oncology 34, 305-311(1989) describe un anticuerpo monoclonal anti-CA125 de ratón OC125 conjugado con daunorubicina que elimina células de cáncer de ovario humano.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

A.

[0007] Se describe aquí polipéptidos celulares (y sus ácidos nucleicos codificantes o fragmentos de los mismos) que son expresados en mayor grado en la superficie de o por uno o más tipos de células cancerosas en comparación con la superficie de o por uno o más tipos de células no cancerosas normales. Estos polipéptidos se refieren aquí como polipéptidos antígenicos diana asociados a tumores (polipéptidos "TAT") y se espera que sirvan como dianas eficaces para la terapia y el diagnóstico contra el cáncer en mamíferos;

una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antígeno diana asociado a tumores o fragmento del mismo (un polipéptido "TAT");

una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos con (a) una molécula de ADN que codifica un polipéptido TAT de longitud completa que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos de polipéptido TAT de longitud completa tal como se describe aquí, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a);

una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, con (a) una molécula de ADN que comprende la secuencia codificante de un ADNc del polipéptido TAT de longitud completa tal como se describe aquí, la secuencia codificante de un polipéptido TAT que carece del péptido señal tal como se describe aquí, la secuencia codificante de un dominio extracelular de un polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o la secuencia codificante de cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT de longitud completa tal como se describe aquí o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a)

una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con (a) una molécula de ADN que codifica el mismo polipéptido maduro codificado por la región codificante de longitud completa de cualquiera de los ADNcs de proteína humana depositados con la ATCC tal como se describe aquí, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a)

una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido TAT que presenta el dominio transmembrana eliminado o inactivado, o es complementaria a dicha secuencia de nucleótidos codificante, donde el dominio o dominios transmembrana de dicho polipéptido o polipéptidos se describen aquí. Por lo tanto, se contemplan los dominios extracelulares solubles de los polipéptidos TAT descritos aquí:

moléculas de ácido nucleico aisladas que se hibridan a (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido TAT que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT de longitud completa tal como se describe aquí, o (b) el complemento de la secuencia de nucleótidos de (a). En este aspecto, una realización de la presente invención se refiere a fragmentos de una secuencia codificante del polipéptido TAT de longitud completa, o el complemento de la misma, tal como se describe aquí, que pueden ser útiles como, por ejemplo, sondas de hibridación útiles como, por ejemplo, sondas de diagnóstico, cebadores PCR, sondas de oligonucleótidos no codificantes, o para codificar fragmentos de un polipéptido TAT de longitud completa que pueden codificar opcionalmente un polipéptido que comprende un sitio de unión para un anticuerpo anti-polipéptido TAT, un oligopéptido de unión a TAT u otra molécula orgánica pequeña que se une a un polipéptido TAT. Dichos fragmentos de ácidos nucleicos tienen normalmente por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 83, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ó 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos referenciada más o menos un 10% de la longitud referenciada. Además, dichos fragmentos de ácido nucleico están comprendidos normalmente de nucleótidos consecutivos derivados de la secuencia codificante de longitud completa de un polipéptido TAT o el complemento de la misma. Cabe indicar que se pueden determinar fragmentos novedosos de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido TAT, o el complemento de la misma, de manera rutinaria mediante la alineación de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido TAT con otras secuencias de nucleótidos conocidas utilizando cualquiera de un conjunto de programas de alineación de secuencias bien conocidos y determinando qué fragmento o fragmentos de la secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido TAT, o el complemento de la misma, son nuevos. Se contemplan en la presente invención todos estos fragmentos nuevos de secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido TAT, o el complemento de la misma. También se contemplan los fragmentos de polipéptido TAT codificados por estos fragmentos de moléculas de nucleótidos, preferiblemente aquellos fragmentos de polipéptido TAT que comprenden un sitio de unión por un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido de unión a TAT u otra molécula orgánica pequeña que se une a un polipéptido TAT;

polipéptidos TAT aislados codificados por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos aislados identificadas

anteriormente aquí;

un polipéptido TAT aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad en la secuencia de aminoácidos, con un polipéptido TAT que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de una proteína polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos descritas aquí o cualquier otro fragmento de específicamente definido de una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT de longitud completa tal como se describe aquí;

un polipéptido TAT aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos, con una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de los ADNcs de proteína humana depositados con la ATCC tal como se describe aquí;

un polipéptido TAT aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida al complemento de una molécula de ADN que codifica (a) un polipéptido TAT que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí, (b) una secuencia de aminoácidos de polipéptido TAT que carece del péptido señal tal como se describe aquí, (c) un dominio extracelular de una proteína de polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí, (d) una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritos aquí o (e) cualquiera de otros fragmentos definidos específicamente de una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT de longitud completa tal como se describe aquí;

un polipéptido TAT aislado sin la secuencia señal N-terminal y/o sin la metionina de iniciación y está codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos descrita anteriormente en la presente invención. También se describe aquí procesos para producir el mismo, donde estos procesos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido TAT y recuperar el polipéptido TAT del cultivo celular;

un polipéptido TAT aislado que presenta el dominio transmembrana eliminado o inactivado. Los procesos para producir el mismo también se describe aquí, donde estos procesos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido TAT y recuperar el polipéptido TAT del cultivo celular.

[0008] También se describen vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos aquí. También se proporcionan las células huésped que comprenden cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células *E. Coli*, o células de levadura. Se proporciona también un proceso para producir cualquiera de los polipéptidos descritos aquí y comprende cultivar las células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular; y

polipéptidos quiméricos aislados que comprenden cualquiera de los polipéptidos TAT descritos aquí fusionados a un polipéptido heterólogo (no TAT). Ejemplos de dichas moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los polipéptidos TAT descritos aquí fusionados a un polipéptido heterólogo, tal como, por ejemplo, una secuencia epítipo etiqueta o una región Fc de una inmunoglobulina.

[0009] La presente invención proporciona un anticuerpo que se une, preferiblemente específicamente, a cualquiera de los polipéptidos descritos anterior o posteriormente tal como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena única o anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo anti-polipéptido TAT a su respectivo epítipo antigénico. Los anticuerpos de la presente invención se conjugan a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferiblemente inhiben el crecimiento o la proliferación o inducen la muerte de una célula a la que se unen; para fines de diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención se pueden marcar para su detección, unirse a un soporte sólido, o similar.

[0010] También se describen aquí vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos aquí. También se describen las células huésped que comprenden cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células *E. Coli*, o células de levadura. Se describe también un proceso para producir cualquiera de los anticuerpos descritos aquí y comprende cultivar las células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo deseado y recuperar el anticuerpo deseado del

cultivo celular.

[0011] También se describen aquí oligopéptidos ("oligopéptidos de unión a TAT") que se unen, preferiblemente específicamente, a cualquiera de los polipéptidos TAT descritos anterior o posteriormente. Opcionalmente, los oligopéptidos de unión a TAT de la presente invención se pueden conjugar a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica, o similar. Los oligopéptidos de unión a TAT de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferiblemente inhiben el crecimiento o proliferación o inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para fines de diagnóstico, los oligopéptidos de unión a TAT de la presente invención se pueden marcar para su detección, unirse a un soporte sólido, o similar.

vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los oligopéptidos de unión a TAT descritos aquí. También se proporciona una célula huésped que comprende cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células *E. Coli*, o células de levadura. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los oligopéptidos de unión a TAT descritos aquí que comprende cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del oligopéptido deseado y recuperar el oligopéptido deseado del cultivo celular;

moléculas orgánicas pequeñas ("moléculas orgánicas de unión a TAT") que se unen, preferiblemente específicamente, a cualquiera de los polipéptidos TAT descritos anterior o posteriormente. Opcionalmente, las moléculas orgánicas de unión a TAT de la presente invención se pueden conjugar a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica, o similar. Las moléculas orgánicas de unión a TAT preferiblemente inhiben el crecimiento o la proliferación o inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para fines de diagnóstico, las moléculas orgánicas de unión a TAT se pueden marcar para su detección, unirse a un soporte sólido, o similar.

[0012] La presente invención se refiere además a una composición de materia que comprende un anticuerpo anti-TAT tal como se define aquí en combinación con un portador. Opcionalmente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

[0013] La presente invención se refiere además a un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición de materia contenida en el recipiente, donde la composición de materia puede comprender un anticuerpo anti-TAT tal como se describe aquí. El artículo puede comprender además opcionalmente una etiqueta fijada al recipiente, o un prospecto incluido con el recipiente, que se refiere al uso de la composición de materia para el tratamiento terapéutico o la detección para diagnóstico de un tumor.

[0014] Otra realización de la presente invención se refiere a la utilización de un anticuerpo anti-polipéptido TAT tal como se describe aquí, para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una afección que es sensible al anticuerpo anti-polipéptido TAT, tal como se define en las reivindicaciones.

[0015] Otras realizaciones de la presente invención se refieren a un anticuerpo aislado que comprende una o más de las secuencias HVR-L1. HVR-L2. HVR-L3, HVR-H1, HVH-H2. o HVR-H3 descritas aquí, o cualquiera de los anticuerpos que se unen al mismo epítipo que cualquiera de dichos anticuerpos definidos en las reivindicaciones.

B. Realizaciones adicionales

[0016] Otra realización de la presente invención se dirige al uso médico en un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa un polipéptido TAT, donde el método comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo que se une al polipéptido TAT, y donde la unión del anticuerpo al polipéptido TAT provoca la inhibición del crecimiento de la célula que expresa el polipéptido TAT tal como se define en las reivindicaciones. En realizaciones preferidas, la célula es una célula cancerosa y la unión del anticuerpo al polipéptido TAT provoca la muerte de la célula que expresa el polipéptido TAT. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, o anticuerpo de cadena única. Los anticuerpos utilizados en los métodos de la presente invención se pueden conjugar opcionalmente a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similar. Los anticuerpos utilizados en los métodos de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas.

[0017] Otra realización de la presente invención se dirige al uso médico en un método para tratar terapéuticamente un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende células que expresan un polipéptido TAT, donde el método comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une al polipéptido TAT, dando lugar así a un tratamiento terapéutico eficaz del tumor tal como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, o anticuerpo de cadena única. Los anticuerpos, oligopéptidos de unión a TAT y moléculas orgánicas de unión a TAT utilizados en los métodos de la presente invención se pueden conjugar opcionalmente a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por

ejemplo, un maitansinoide o caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similar. Los anticuerpos y oligopéptidos utilizados en los métodos de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas.

[0018] La presente invención también se refiere a un método para determinar la presencia de un polipéptido TAT en una muestra sospechosa de contener el polipéptido TAT, donde el método comprende exponer la muestra a un anticuerpo que se une al polipéptido TAT y determinar la unión del anticuerpo al polipéptido TAT en la muestra, donde la presencia de dicha unión es indicativa de la presencia del polipéptido TAT en la muestra. Opcionalmente, la muestra puede contener células (que pueden ser células cancerosas) sospechosas de expresar el polipéptido TAT. El anticuerpo utilizado en el método opcionalmente se puede marcar para su detección, unirse a un soporte sólido, o similar.

[0019] La presente invención también se refiere a un método de diagnóstico de la presencia de un tumor en un mamífero, donde el método comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido TAT (a) en una muestra de prueba de células de tejido obtenidas de dicho mamífero, y (b) en una muestra de control de células no cancerosas normales conocidas del mismo origen o tipo de tejido, donde un nivel de expresión del polipéptido TAT más elevado en la muestra de prueba, en comparación con la muestra de control, es indicativo de la presencia de un tumor en el mamífero del que se obtuvo la muestra de prueba.

[0020] Otra realización de la presente invención se dirige a un método de diagnóstico de la presencia de un tumor en un mamífero, donde el método comprende (a) poner en contacto una muestra de prueba que comprende células de tejido obtenidas del mamífero con un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica pequeña, que se une a un polipéptido TAT y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica pequeña y el polipéptido TAT en la muestra de prueba, donde la formación de un complejo es indicativo de la presencia de un tumor en el mamífero, tal como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, el anticuerpo utilizado se puede marcar para su detección, unirse a un soporte sólido, o similar, y/o la muestra de prueba de células de tejido se obtiene de un individuo sospechoso de tener un tumor canceroso.

[0021] También se describe aquí un método de tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo celular asociado con una expresión o actividad alterada, preferiblemente incrementada, de un polipéptido TAT, comprendiendo el método administrar a un sujeto con necesidad de dicho tratamiento una cantidad eficaz de un antagonista de un polipéptido TAT. Preferiblemente, el trastorno proliferativo celular es cáncer y el antagonista del polipéptido TAT es un anticuerpo anti-polipéptido TAT. El tratamiento o prevención eficaz del trastorno proliferativo celular puede ser resultado de la citólisis directa o la inhibición del crecimiento de células que expresan un polipéptido TAT o mediante la antagonización de la actividad potenciadora del crecimiento celular de un polipéptido TAT.

[0022] La presente invención también se refiere a un método de unión de un anticuerpo a una célula que expresa un polipéptido TAT, donde el método comprende poner en contacto una célula que expresa un polipéptido TAT con dicho anticuerpo bajo condiciones que son adecuadas para la unión del anticuerpo a dicho polipéptido TAT y permitir la unión entre ellos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo está marcado con una molécula o compuesto que es útil para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de la localización y/o cantidad de unión del anticuerpo a la célula.

[0023] La presente invención también se refiere al uso de anticuerpo anti-polipéptido TAT en la preparación de un medicamento útil para (i) el tratamiento terapéutico o detección de diagnóstico de un cáncer o tumor, o (ii) el tratamiento o prevención terapéutica de un trastorno proliferativo celular.

[0024] La presente invención también se refiere a un método para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa, donde el crecimiento de dicha célula cancerosa es por lo menos en parte dependiente del efecto o efectos potenciadores del crecimiento de un polipéptido TAT (donde el polipéptido TAT puede ser expresado por la propia célula cancerosa o una célula que produce el polipéptido o polipéptidos que tienen un efecto potenciador del crecimiento en células cancerosas), donde el método comprende poner en contacto el polipéptido TAT con un anticuerpo que se une al polipéptido TAT, antagonizando así la actividad potenciadora del crecimiento del polipéptido TAT y, a su vez, inhibiendo el crecimiento de la célula cancerosa. Preferiblemente, el crecimiento de la célula cancerosa se inhibe completamente. Más preferiblemente, la unión del anticuerpo al polipéptido TAT induce la muerte de la célula cancerosa. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, o anticuerpo de cadena única. Los anticuerpos utilizados en los métodos de la presente invención se pueden conjugar opcionalmente a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similar. Los anticuerpos utilizados en los métodos de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas.

[0025] La presente invención también se refiere a un método de tratamiento terapéutico de un tumor en un mamífero, donde el crecimiento de dicho tumor es por lo menos en parte dependiente del efecto o efectos potenciadores del crecimiento de un polipéptido TAT, donde el método comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une al polipéptido TAT, antagonizando así la actividad

potenciadora del crecimiento de dicho polipéptido TAT y dando lugar al tratamiento terapéutico eficaz del tumor. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, o anticuerpo de cadena única. Los anticuerpos utilizados en los métodos de la presente invención se pueden conjugar opcionalmente a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similar. Los anticuerpos utilizados en los métodos de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas.

C.

[0026] También se describe el siguiente juego de potenciales reivindicaciones para esta solicitud:

- 10 1. Ácido nucleico aislado que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con:
 - (a) una molécula de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;
 - (b) una molécula de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
 - 15 (c) una molécula de ADN que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;
 - (d) una molécula de ADN que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
 - (e) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1;
 - 20 (f) la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
 - (g) el complemento de (a), (b), (c), (d), (e) o (f).
2. Ácido nucleico aislado que tiene;
 - (a) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;
 - (b) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
 - 25 (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;
 - (d) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
 - 30 (e) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1;
 - (f) la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
 - (g) el complemento de (a), (b), (c), (d), (e) o (f).
3. Ácido nucleico aislado que se hibrida a:
 - (a) un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;
 - 35 (b) un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
 - (c) un ácido nucleico que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;
 - (d) un ácido nucleico que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece su péptido señal asociado;
 - 40 (e) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1;
 - (f) la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
 - (g) el complemento de (a), (b), (c), (d), (e) o (f).
4. Ácido nucleico según la reivindicación 3, en el que la hibridación tiene lugar bajo condiciones rigurosas.

5. Ácido nucleico según la reivindicación 3, que tiene por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud.
6. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 1, 2 ó 3.
7. Vector de expresión según la reivindicación 6, en el que dicho ácido nucleico está unido operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector.
- 5 8. Célula huésped que comprende el vector de expresión según la reivindicación 7.
9. Célula huésped según la reivindicación 8 que es una célula CHO, una célula de *E. Coli* o una célula de levadura.
10. Proceso para producir un polipéptido que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 8 bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido y recuperar dicho polipéptido de dicho cultivo celular.
11. Polipéptido aislado que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con:
 - 10 (a) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2;
 - (b) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
 - (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;
 - (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
 - (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
 - 15 (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.
12. Polipéptido aislado que tiene:
 - (a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;
 - (b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
 - 20 (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su secuencia de péptido señal asociado;
 - (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
 - 25 (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
 - (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.
13. Polipéptido quimérico que comprende el polipéptido según la reivindicación 11 ó 12 fusionado a un polipéptido heterólogo.
- 30 14. Polipéptido quimérico según la reivindicación 13, en el que dicho polipéptido heterólogo es una secuencia de epítipo etiqueta o una región Fc de una inmunoglobulina.
15. Anticuerpo aislado que se une a un polipéptido que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con:
 - (a) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2.
 - 35 (b) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
 - (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;
 - (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
 - (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
 - 40 (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.
16. Anticuerpo aislado que se une a un polipéptido que tiene:

- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;
- (b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- 5 (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su secuencia de péptido señal asociado;
- (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
- 10 (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.
17. Anticuerpo según la reivindicación 15 ó 16 que es un anticuerpo monoclonal.
18. Anticuerpo según la reivindicación 15 ó 16 que es un fragmento de anticuerpo.
19. Anticuerpo según la reivindicación 15 ó 16 que es un anticuerpo quimérico o humanizado.
20. Anticuerpo según la reivindicación 15 ó 16 que está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.
- 15 21. Anticuerpo según la reivindicación 15 ó 16 que está conjugado a un agente citotóxico.
22. Anticuerpo según la reivindicación 21, en el que el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.
23. Anticuerpo según la reivindicación 21, en el que el agente citotóxico es una toxina.
- 20 24. Anticuerpo según la reivindicación 23, en el que la toxina se selecciona del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.
25. Anticuerpo según la reivindicación 23, en el que la toxina es un maitansinoide.
26. Anticuerpo según la reivindicación 15 ó 16 que es producido en bacterias.
27. Anticuerpo según la reivindicación 15 ó 16, que es producido en células CHO.
28. Anticuerpo según la reivindicación 15 ó 16 que induce la muerte de una célula a la que se une.
- 25 29. Anticuerpo según la reivindicación 15 ó 16 que se marca para su detección.
30. Ácido nucleico aislado que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo según la reivindicación 15 ó 16.
31. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 30 unido operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector.
- 30 32. Célula huésped que comprende el vector de expresión según la reivindicación 31.
33. Célula huésped según la reivindicación 32 que es una célula CHO, una célula de *E. Coli* o una célula de levadura.
34. Proceso para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 32 bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho anticuerpo y recuperar dicho anticuerpo del cultivo celular.
- 35 35. Un oligopéptido aislado que se une a un polipéptido que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con:
- (a) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2
- (b) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2 que carece de su péptido señal asociado;
- (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;
- 40 (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
- (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.

36. Oligopéptido aislado que se une a un polipéptido que tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;

5 (b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su secuencia de péptido señal asociado;

10 (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.

37. Oligopéptido según la reivindicación 35 ó 36 que está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

15 38. Oligopéptido según la reivindicación 35 ó 36 que está conjugado a un agente citotóxico.

39. Oligopéptido según la reivindicación 38, en el que el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.

40. Oligopéptido según la reivindicación 38, en el que el agente citotóxico es una toxina.

20 41. Oligopéptido según la reivindicación 40, en el que la toxina se selecciona del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.

42. Oligopéptido según la reivindicación 40, en el que la toxina es un maitansinoide.

43. Oligopéptido según la reivindicación 35 ó 36, que induce la muerte de una célula a la que se une.

44. Oligopéptido según la reivindicación 35 ó 36, que está marcado de forma detectable.

25 45. Molécula orgánica de unión a TAT que se une a un polipéptido que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con:

(a) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2;

(b) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;

30 (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.

46. Molécula orgánica según la reivindicación 45 que se une a un polipéptido que tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;

35 (b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su secuencia de péptido señal asociado;

40 (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.

47. Molécula orgánica según la reivindicación 45 ó 46, que está conjugada a un agente inhibidor del crecimiento.

48. Molécula orgánica según la reivindicación 45 ó 46, que está conjugada a un agente citotóxico.

5 49. Molécula orgánica según la reivindicación 48, en la que el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.

50. Molécula orgánica según la reivindicación 48, en la que el agente citotóxico es una toxina.

51. Molécula orgánica según la reivindicación 50, en la que la toxina se selecciona del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.

10 52. Molécula orgánica según la reivindicación 50, en la que la toxina es un maitansinoide.

53. Molécula orgánica según la reivindicación 45 ó 46 que induce la muerte de una célula a la que se une.

54. Molécula orgánica según la reivindicación 45 ó 46 que está marcada de forma detectable.

55. Composición de materia que comprende:

(a) el polipéptido según la reivindicación 11;

15 (b) el polipéptido según la reivindicación 12;

(c) el polipéptido quimérico según la reivindicación 13;

(d) anticuerpo según la reivindicación 15;

(e) anticuerpo según la reivindicación 16;

(f) oligopéptido según la reivindicación 35;

20 (g) oligopéptido según la reivindicación 36;

(h) la molécula orgánica de unión a TAT según la reivindicación 45; o

(i) la molécula orgánica de unión a TAT según la reivindicación 46; en combinación con un portador.

56. Composición de materia según la reivindicación 55, en la que dicho portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

25 57. Artículo de fabricación, que comprende:

(a) un recipiente; y

(b) la composición de materia según la reivindicación 55 contenida en dicho recipiente.

58. Artículo de fabricación según la reivindicación 57 que comprende además una etiqueta fijada a dicho recipiente, o un prospecto incluido en dicho recipiente, que se refieren al uso de dicha composición de materia para el tratamiento terapéutico o la detección de diagnóstico de un cáncer.

30

59. Método de inhibición del crecimiento de una célula que expresa una proteína que tiene al menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con:

(a) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2;

(b) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece su péptido señal asociado;

35 (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica que se une a dicha proteína, la unión de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína, causando así la inhibición del crecimiento de dicha célula.

40

60. Método según la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
61. Método según la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
62. Método según la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.
63. Método según la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.
64. Método según la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga a un agente citotóxico.
65. Método según la reivindicación 64, en el que dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.
66. Método según la reivindicación 64, en el que el agente citotóxico es una toxina.
67. Método según la reivindicación 66, en el que la toxina se selecciona del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.
68. Método según la reivindicación 66, en la que la toxina es un maitansinoide.
69. Método según la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo es producido en bacterias.
70. Método según la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo es producido en células CHO.
71. Método según la reivindicación 59, en el que dicha célula es una célula cancerosa.
72. Método según la reivindicación 71, en el que dicha célula cancerosa se expone además a tratamiento por radiación o un agente quimioterapéutico.
73. Método según la reivindicación 71, en el que dicha célula cancerosa se selecciona del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de cáncer de hígado, una célula de cáncer de vejiga, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer cervical, una célula de melanoma y una célula de leucemia.
74. Método según la reivindicación 71, en el que dicha proteína se expresa de manera más abundante por dicha célula cancerosa en comparación con una célula normal del mismo origen de tejido.
75. Método según la reivindicación 59, que causa la muerte de dicha célula.
76. Método según la reivindicación 59, en el que dicha proteína tiene:
 - (a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;
 - (b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
 - (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su secuencia de péptido señal asociado;
 - (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
 - (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
 - (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.
77. Método de tratamiento terapéutico de un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende las células que expresan una proteína que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con:
 - (a) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2;
 - (b) el polipéptido mostrad como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
 - (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;
 - (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;

- (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
- (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica que se une a dicha proteína, tratando así de manera efectiva dicho mamífero.
- 5 78. Método según la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
79. Método según la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
80. Método según la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.
81. Método según la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.
- 10 82. Método según la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga a un agente citotóxico
83. Método según la reivindicación 82, en el que dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.
- 15 84. Método según la reivindicación 82, en el que el agente citotóxico es una toxina.
85. Método según la reivindicación 84, en el que la toxina se selecciona del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.
86. Método según la reivindicación 84, en la que la toxina es un maitansinoide.
87. Método según la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo es producido en bacterias.
- 20 88. Método según la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo es producido en células CHO.
89. Método según la reivindicación 77, en el que dicho tumor se expone además a tratamiento con radiación o un agente quimioterapéutico.
90. Método según la reivindicación 77, en el que dicho tumor es un tumor de mama, un tumor colorrectal, un tumor de pulmón, un tumor de ovario, un tumor del sistema nervioso central, un tumor del hígado, un tumor de la vejiga, un tumor, un tumor pancreático o un tumor cervical.
- 25 91. Método según la reivindicación 77, en el que dicha proteína se expresa de manera más abundante por las células cancerosas de dicho tumor en comparación con una célula normal del mismo origen de tejido.
92. Método según la reivindicación 77, en el que dicha proteína tiene:
- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;
- 30 (b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su secuencia de péptido señal asociado;
- (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- 35 (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
- (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.
93. Método de determinación de la presencia de una proteína en una muestra sospechosa de contener dicha proteína, donde dicha proteína tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con:
- 40 (a) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2;
- (b) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
- (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;
- (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;

- (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
- (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1, comprendiendo dicho método exponer dicha muestra a un anticuerpo, oligopéptido o moléculas orgánicas que se une a dicha proteína y determinar la unión de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína en dicha muestra, donde la unión del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína es indicativa de la presencia de dicha proteína en dicha muestra.
- 5 94. Método según la reivindicación 93, en el que dicha muestra comprende una célula sospechosa de expresar dicha proteína.
95. Método según la reivindicación 94, en el que dicha célula es una célula cancerosa.
- 10 96. Método según la reivindicación 93, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se marca para su detección.
97. Método según la reivindicación 93, en el que dicha proteína tiene:
- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;
- 15 (b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su secuencia de péptido señal asociado;
- (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- 20 (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
- (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.
98. Método de diagnóstico de la presencia de un tumor en un mamífero, comprendiendo dicho método determinar el nivel de expresión de un gen que codifica una proteína que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con:
- 25 (a) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2;
- (b) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
- (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;
- (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
- 30 (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
- (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1, en una muestra de prueba de células de tejido obtenidas de dicho mamífero y en una muestra de control de células normales conocidas del mismo origen de tejido, donde un nivel más elevado de expresión de dicha proteína en la muestra de prueba, en comparación con la muestra de control, es indicativa de la presencia de tumor en el mamífero del que se obtuvo la muestra de prueba.
- 35 99. Método según la reivindicación 98, en el que la etapa de determinar el nivel de expresión de un gen que codifica dicha proteína comprende emplear un oligonucleótido en una hibridación in situ o análisis RT-PCR.
100. Método según la reivindicación 98, en el que la etapa de determinar el nivel de expresión de un gen que codifica dicha proteína comprende emplear un anticuerpo en un análisis por inmunohistoquímica o transferencia Western
- 40 101. Método según la reivindicación 98, en el que dicha proteína tiene:
- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;
- (b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- 45 (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su secuencia de péptido señal asociado;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o

5 (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.

102. Método de diagnóstico de la presencia de un tumor en un mamífero, comprendiendo dicho método poner en contacto una muestra de prueba de células de tejido obtenidas de dicho mamífero con un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica que se une a una proteína que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con:

10 (a) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2;

(b) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o

15 (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1, y detectar la formación de un complejo entre dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica y dicha proteína en la muestra de prueba, donde la formación de un complejo es indicativa de la presencia de un tumor en dicho mamífero.

20 103. Método según la reivindicación 102, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica de marca para su detección.

104. Método según la reivindicación 102, en el que dicha muestra de prueba de células de tejido se obtiene de un individuo sospechoso de tener un tumor canceroso.

105. Método según la reivindicación 102, en el que dicha proteína tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;

25 (b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su secuencia de péptido señal asociado;

30 (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.

35 106. Método de tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo celular asociado con un aumento de la expresión o actividad de una proteína que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con:

(a) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2;

(b) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;

40 (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o

45 (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto con necesidad de dicho tratamiento una cantidad eficaz de un antagonista de dicha proteína, tratando o previniendo de este modo de manera eficaz dicho trastorno proliferativo celular.

107. Método según la reivindicación 106, en el que dicho trastorno proliferativo celular es cáncer.
108. Método según la reivindicación 106, en el que dicho antagonista es un anticuerpo anti-polipéptido TAT, oligopéptido de unión a TAT, molécula orgánica de unión a TAT o oligonucleótido no codificante.
- 5 109. Método de unión de un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a una célula que expresa una proteína que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con:
- (a) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2;
- (b) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
- (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;
- (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
- 10 (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
- (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica que se une a dicha proteína y que permite que tenga lugar la unión del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína, uniéndose de este modo dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha célula.
- 15 110. Método según la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
111. Método según la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
112. Método según la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.
- 20 113. Método según la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.
114. Método según la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga a un agente citotóxico.
115. Método según la reivindicación 114, en el que dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.
- 25 116. Método según la reivindicación 114, en el que el agente citotóxico es una toxina.
117. Método según la reivindicación 116, en el que la toxina se selecciona del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.
118. Método según la reivindicación 116, en la que la toxina es un maitansinoide.
119. Método según la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo es producido en bacterias.
- 30 120. Método según la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo es producido en células CHO.
121. Método según la reivindicación 109, en el que dicha célula es una célula cancerosa.
122. Método según la reivindicación 121, en el que dicha célula cancerosa se expone además a tratamiento por radiación o un agente quimioterapéutico.
- 35 123. Método según la reivindicación 121, en el que dicha célula se selecciona del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de cáncer de hígado, una célula de cáncer de vejiga, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer cervical, una célula de melanoma y una célula de leucemia.
- 40 124. Método según la reivindicación 123, en el que dicha proteína se expresa de manera más abundante por dicha célula cancerosa en comparación con una célula normal del mismo origen de tejido.
125. Método según la reivindicación 109 que causa la muerte de dicha célula.
126. Uso de un ácido nucleico tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 30 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o detección de diagnóstico de un cáncer.
- 45 127. Uso de un ácido nucleico tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 30 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.

128. Uso de un ácido nucleico tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 30 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo celular.
129. Uso de un vector de expresión tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 ó 31 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o detección de diagnóstico de un cáncer.
- 5 130. Uso de un vector de expresión tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 ó 31 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
131. Uso de un vector de expresión tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 ó 31 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo celular.
- 10 132. Uso de una célula huésped tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 8, 9, 32, ó 33 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o detección de diagnóstico de un cáncer.
133. Uso de una célula huésped tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 8, 9, 32 ó 33 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
134. Uso de una célula huésped tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 8, 9, 32 ó 33 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo celular.
- 15 135. Uso de un polipéptido tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o detección de diagnóstico de un cáncer.
136. Uso de un polipéptido tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
- 20 137. Uso de un polipéptido tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo celular.
138. Uso de un anticuerpo tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 15 a 29 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o detección de diagnóstico de un cáncer.
139. Uso de un anticuerpo tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 15 a 29 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
- 25 140. Uso de un anticuerpo tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 15 a 29 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo celular.
141. Uso de un oligopéptido tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 35 a 44 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o detección de diagnóstico de un cáncer.
- 30 142. Uso de un oligopéptido tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 35 a 44 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
143. Uso de un oligopéptido tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 35 a 44 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo celular.
144. Uso de una molécula orgánica de unión a TAT tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 45 a 54 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o detección de diagnóstico de un cáncer.
- 35 145. Uso de una molécula orgánica de unión a TAT tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 45 a 54 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
146. Uso de una molécula orgánica de unión a TAT tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 45 a 54 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo celular.
- 40 147. Uso de una composición de materia tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 55 ó 56 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o detección de diagnóstico de un cáncer.
148. Uso de una composición de materia tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 55 ó 56 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
149. Uso de una composición de materia tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 55 ó 56 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo celular.
- 45 150. Uso de un artículo de fabricación tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 57 ó 58 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o detección de diagnóstico de un cáncer.

151. Uso de un artículo de fabricación tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 57 ó 58 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
152. Uso de un artículo de fabricación tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 57 ó 58 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo celular.
- 5 153. Método para inhibir el crecimiento de una célula, en el que el crecimiento de dicha célula es por lo menos, en parte, dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de una proteína que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con:
- (a) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2;
- (b) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
- 10 (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;
- (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
- (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
- (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha proteína con un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica que se une a dicha proteína, inhibiendo así el crecimiento de dicha célula.
- 15 154. Método según la reivindicación 153, en el que dicha célula es una célula cancerosa.
155. Método según la reivindicación 153, en el que dicha proteína es expresada por dicha célula.
156. Método según la reivindicación 153, en el que la unión de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína antagoniza una actividad potenciadora del crecimiento celular de dicha proteína.
- 20 157. Método según la reivindicación 153, en el que la unión de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína induce la muerte de dicha célula.
158. Método según la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
159. Método según la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
160. Método según la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.
- 25 161. Método según la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.
162. Método según la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga a un agente citotóxico.
- 30 163. Método según la reivindicación 162, en el que dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.
164. Método según la reivindicación 162, en el que el agente citotóxico es una toxina.
165. Método según la reivindicación 164, en el que la toxina se selecciona del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.
166. Método según la reivindicación 164, en la que la toxina es un maitansinoide.
- 35 167. Método según la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo es producido en bacterias.
168. Método según la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo es producido en células CHO.
169. Método según la reivindicación 153, en el que dicha proteína tiene:
- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;
- 40 (b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su secuencia de péptido señal asociado;

- (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
- 5 (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.
170. Método de tratamiento terapéutico de un tumor en un mamífero, en el que el crecimiento de dicho tumor es, por lo menos, en parte, dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de una proteína que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con:
- (a) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2;
- 10 (b) el polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
- (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su péptido señal asociado;
- (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su péptido señal asociado;
- (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o
- 15 (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha proteína con un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica que se une a dicha proteína, tratando así de manera eficaz dicho tumor.
171. Método según la reivindicación 170, en el que dicha proteína se expresa por células de dicho tumor.
172. Método según la reivindicación 170, en el que la unión de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína antagoniza una actividad potenciadora del crecimiento celular de dicha proteína.
- 20 173. Método según la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
174. Método según la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
175. Método según la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.
176. Método según la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.
- 25 177. Método según la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga a un agente citotóxico.
178. Método según la reivindicación 177, en el que dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.
179. Método según la reivindicación 177, en el que el agente citotóxico es una toxina.
- 30 180. Método según la reivindicación 179, en el que la toxina se selecciona del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.
181. Método según la reivindicación 179, en el que la toxina es un maitansinoide.
182. Método según la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo es producido en bacterias.
183. Método según la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo es producido en células CHO.
- 35 184. Método según la reivindicación 170, en el que dicha proteína tiene:
- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2;
- (b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- 40 (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, con su secuencia de péptido señal asociado;
- (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEC ID NO: 2, que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID NO: 1.

186. Anticuerpo aislado que se une al mino epítipo unido por un anticuerpo producido por cualquiera de las líneas celulares de hibridoma mostradas en la Tabla 11.

5 187. Anticuerpo según la reivindicación 186 que es un anticuerpo monoclonal.

188. Anticuerpo según la reivindicación 186 que es un fragmento de anticuerpo.

189. Anticuerpo según la reivindicación 186 que es un anticuerpo quimérico o humanizado.

190. Anticuerpo según la reivindicación 186 que está conjugado con un agente inhibidor del crecimiento.

191. Anticuerpo según la reivindicación 186 que está conjugado con un agente citotóxico.

10 192. Anticuerpo según la reivindicación 191, en el que dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.

193. Anticuerpo según la reivindicación 191, en el que el agente citotóxico es una toxina.

194. Anticuerpo según la reivindicación 193, en el que la toxina se selecciona del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.

15 195. Anticuerpo según la reivindicación 193, en el que la toxina es un maitansinoide.

196. Anticuerpo según la reivindicación 186, que es producido en bacterias.

197. Anticuerpo según la reivindicación 186, que es producido en células CHO.

198. Anticuerpo según la reivindicación 186, que induce la muerte de una célula a la que se une.

199. Anticuerpo según la reivindicación 186, que está marcado para su detección.

20 200. Anticuerpo según la reivindicación 186, que comprende por lo menos una de las regiones determinantes de complementariedad de cualquiera de los anticuerpos producidos por cualquiera de las líneas celulares de hibridoma mostradas en la Tabla 11.

201. Anticuerpo monoclonal producido por cualquiera de las células de hibridoma mostradas en la tabla 11.

202. Célula de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a un polipéptido TAT.

25 203. Método de identificación de un anticuerpo que se une a un epítipo unido por un anticuerpo producido por cualquiera de las líneas celulares de hibridoma mostradas en la Tabla 11, comprendiendo dicho método determinar la capacidad de un primer anticuerpo de bloquear la unión de un segundo anticuerpo producido por cualquiera de las líneas celulares de hibridoma mostradas en la Tabla 11 a un polipéptido TAT, en el que la capacidad de dicho primer anticuerpo de bloquear la unión de dicho segundo anticuerpo a dicho polipéptido TAT en por lo menos un 40% y a
30 concentraciones iguales de anticuerpo es indicativa de que dicho primer anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo unido por dicho segundo anticuerpo.

[0027] Realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes para el experto en la materia tras leer la presente memoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 [0028]

Las figuras 1A-E muestran una secuencia de nucleótidos (SEC ID NO:1) de un ADNc de TAT10772, donde la SEC ID NO:1 es un clon designado aquí como "DNA772".

Las figuras 2A-B muestran la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO:2) derivada de la secuencia codificante de SEC ID NO:1 mostrada en la figura 1.

40 La figura 3 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras variables para las siguientes: secuencia consenso del subgrupo I humano de cadena ligera (huKI; SEC ID NO:3), anticuerpo anti-TAT10772 11D10 murino (mu11D10-L; SEC ID NO:4), y anticuerpo "humanizado" injertado anti-TAT10772 11D10 (11D10-injerto ("injerto" equivale a "graft" en los dibujos); SEC ID NO:5).

45 La figura 4 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas variables para las siguientes: secuencia consenso del subgrupo III humana de cadena pesada (hum III; SEC ID NO:6), anticuerpo anti-

TAT10772 11D10 murino (mu11D10-H; SEC ID NO:7), y anticuerpo "humanizado" injertado anti-TAT10772 11D10 (11D10-injerto; SEC ID NO:8).

La figura 5 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras variables para las siguientes: secuencia consenso del subgrupo I humana de cadena ligera (huKI; SEC ID NO:3), anticuerpo anti-TAT10772 3A5 murino (mu3A5-L; SEC ID NO:9), y anticuerpo "humanizado" injertado anti-TAT10772 3A5 (3A5-injerto; SEC ID NO:10).

La figura 6 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas variables para las siguientes: secuencia consenso del subgrupo III humana de cadena pesada (hum III; SEC ID NO:6), anticuerpo anti-TAT10772 3A5 murino (mu3A5-H; SEC ID NO:11), anticuerpo "humanizado" injertado anti-TAT10772 3A5 "variante L" (3A5.L-injerto; SEC ID NO:12), y anticuerpo "humanizado" injertado anti-TAT10772 3A5 "variante F" (3A5.F-injerto; SEC ID NO:13).

La figura 7 muestra varias secuencias de HVR-L1 (SEC ID NOS:14-34) de anticuerpos derivados de 11D10 madurados para afinidad.

La figura 8 muestra varias secuencias de HVR-L2 (SEC ID NOS:35-58) de anticuerpos derivados de 11D10 madurados para afinidad.

La figura 9 muestra varias secuencias de HVR-L3 (SEC ID NOS:59-73) de anticuerpos derivados de 11D10 madurados para afinidad.

La figura 10 muestra varias secuencias de HVR-H1 (SEC ID NOS:74-93) de anticuerpos seleccionados derivados de 11D10 madurados para afinidad.

La figura 11 muestra varias secuencias de HVR-H2 (SEC ID NOS:94-112) de anticuerpos seleccionados derivados de 11D10 madurados para afinidad.

La figura 12 muestra varias secuencias de HVR-H3 (SEC ID NOS:113-118) de anticuerpos seleccionados derivados de 11D10 madurados para afinidad.

La figura 13 muestra una secuencia de HVR-L1 (SEC ID NO:119) de un anticuerpo seleccionado derivado de 3A5 madurado para afinidad.

La figura 14 muestra varias secuencias de HVR-L2 (SEC ID NOS:120-121) de anticuerpos seleccionados derivados de 3A5 madurados para afinidad.

La figura 15 muestra una secuencia de HVR-L3 (SEC ID NO:122) de un anticuerpo seleccionado derivado de 3A5 madurado para afinidad.

La figura 16 muestra una secuencia de HVR-H1 (SEC ID NO:123) de un anticuerpo seleccionado derivado de 3A5 madurado para afinidad.

La figura 17 muestra varias secuencias de HVR-H2 (SEC ID NOS:124-127) de anticuerpos seleccionados derivados de 3A5 madurados para afinidad.

Las figuras 18A-B muestra varias secuencias de HVR-H3 (SEC ID NOS:128-183) de anticuerpos seleccionados derivados de 3A5 madurados para afinidad.

La figura 19 muestra secuencias de armazón de consenso humanas aceptoras de ejemplo para utilizar en la práctica de la presente invención con los identificadores de secuencia siguientes: armazón de consenso VH de subgrupo I humano menos CDRs de Kabat (SEC ID N° 184), armazón de consenso VH de subgrupo I humano menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID N° 185 a 187), armazón de consenso VH de subgrupo II humano menos CDRs de Kabat (SEC ID N° 188), armazón de consenso VH de subgrupo II humano menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID N° 189 a 191), armazón de consenso VH de subgrupo III humano menos CDRs de Kabat "variante L" (SEC ID N° 192) y armazón de consenso VH de subgrupo III humano menos CDRs de Kabat "variante F" (SEC ID N° 193).

La figura 20 muestra secuencias de armazón de consenso humanas aceptoras de ejemplo para utilizar en la práctica de la presente invención con los identificadores de secuencia siguientes: armazón de consenso VL de subgrupo I *kappa* humano menos CDRs de Kabat (SEC ID N° 194), armazón de consenso VL de subgrupo II *kappa* humano menos CDRs de Kabat (SEC ID N° 195), armazón de consenso VL de subgrupo III *kappa* humano menos CDRs de Kabat (SEC ID N° 196) y armazón de consenso VL de subgrupo IV *kappa* humano menos CDRs de Kabat (SEC ID N° 197).

Las figuras 21A-B muestran las secuencias de cadena pesada variable completa para los siguientes anticuerpos: 3A5v1 (SEC ID NO:198), 3A5v2 (SEC ID NO:199), 3A5v3 (SEC ID NO:200), 3A5v4 (SEC ID NO:201), 3A5v5 (SEC ID NO:202), 3A5v6 (SEC ID NO:203), 3A5v7 (SEC ID NO:204), 3A5v8 (SEC ID NO:205), 3A5v1b.52 (SEC ID

NO:206), 3A5v1b. 54 (SEC ID NO:207), 3A5v4b.52 (SEC ID NO:208), y 3A5v4b.54 (SEC ID NO:209). Todos estos anticuerpos contienen la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable huK1 de SEC ID NO. 3.

La figura 22 muestra las secuencias de cadena ligera variable completas (SEC ID NOS:210-211) utilizadas para ciertos anticuerpos anti-TAT10772 descritos aquí.

- 5 La figura 23 muestra la capacidad de anticuerpos 3A5 humanizados para inhibir la unión de 3A5 quimérico marcado con rutenio a un polipéptido TAT10772 diana con el dominio 5' biotinilado. "h2H7 ctr" es un anticuerpo de control negativo que no se une específicamente a TAT10772.

- 10 La figura 24 muestra la capacidad de varios anticuerpos 3A5 humanizados de inhibir la unión de 3A5 quimérico marcado con rutenio a un polipéptido CA125 biotinilado. "h2H7 ctr" es un anticuerpo de control negativo que no se une específicamente a TAT10772.

La figura 25 muestra los resultados de un análisis ELISA utilizando varios anticuerpos 3^{as} humanizados para medir la unión a células OVCAR-3. "h2H7 ctr" es un anticuerpo de control negativo que no se une específicamente a TAT10772.

- 15 La figura 26 muestra la proliferación in vitro de células OVCAR-3 (que expresan endógenamente el polipéptido TAT10772) después del tratamiento con anticuerpos quiméricos 11D10-vc-MMAF o anticuerpos quiméricos 3A5-vc-MMAF.

La figura 27 muestra la proliferación in vitro de células OVCAR-3 (que expresan endógenamente el polipéptido TAT10772) después del tratamiento con anticuerpos quiméricos 11D10-vc-MMAE o anticuerpos quiméricos 3A5-vc-MMAE.

- 20 La figura 28 muestra la proliferación in vitro de células OVCAR-3 (que expresan endógenamente el polipéptido TAT10772) después del tratamiento con anticuerpos quiméricos 11D10-MC-MMAF o anticuerpos quiméricos 3A5-MC-MMAF.

- 25 La figura 29 muestra la proliferación in vitro de células PC3 transfectadas con un vector que permite que estas células expresen el polipéptido TAT10772 (PC3/A5.3B2) o células PC3 que no expresan el polipéptido TAT10772 (PC3/neo) después del tratamiento con anticuerpos quiméricos 11D10-vc-MMAF o anticuerpos quiméricos 3A5-vc-MMAF.

- 30 La figura 30 muestra la proliferación in vitro de células PC3 transfectadas con un vector que permite que estas células expresen el polipéptido TAT10772 (PC3/A5.3B2) o células PC3 que no expresan el polipéptido TAT10772 (PC3/neo) después del tratamiento con anticuerpos quiméricos 11D10-vc-PAB-MMAE o anticuerpos quiméricos 3A5-vc-PAB-MMAE.

La figura 31 muestra la proliferación in vitro de células PC3 transfectadas con un vector que permite que estas células expresen el polipéptido TAT10772 (PC3/A5.3B2) o células PC3 que no expresan el polipéptido TAT10772 (PC3/neo) después del tratamiento con anticuerpos quiméricos 11D10-MC-MMAF o anticuerpos quiméricos 3A5-MC-MMAf.

- 35 La figura 32 muestra mediciones del volumen tumoral promedio in vivo (modelo de inyección subcutánea) en tumores derivados de PC3/A5.3B2 después del tratamiento con varios anticuerpos 3A5 quiméricos conjugados a toxina, anticuerpos de control o vehículo solo.

- 40 La figura 33 muestra mediciones del volumen tumoral promedio in vivo (modelo de ratón beige SCID con trasplante de la almohadilla adiposa mamaria) en tumores derivados de OVCAR-3 después del tratamiento con varios anticuerpos 3A5 quiméricos conjugados a toxina, anticuerpos de control o vehículo solo.

- La figura 34 muestra mediciones del volumen tumoral promedio in vivo (modelo de ratón beige SCID con trasplante de la almohadilla adiposa mamaria) en tumores derivados de OVCAR-3 después del tratamiento con varios anticuerpos 3A5 quiméricos conjugados a toxina, anticuerpos de control o vehículo solo.

- 45 La figura 35 muestra mediciones del volumen tumoral promedio in vivo (modelo de ratón beige SCID con trasplante de la almohadilla adiposa mamaria) en tumores derivados de OVCAR-3 después del tratamiento con varios anticuerpos 3A5 quiméricos conjugados a toxina, anticuerpos de control o vehículo solo.

La figura 36 muestra mediciones del volumen tumoral promedio in vivo (tumores de xenoinjerto en ratones desnudos, 10 millones de células por ratón) en tumores derivados de PC3/A5.3B2 después del tratamiento con varios anticuerpos 3A5 quiméricos conjugados a toxina, anticuerpos de control o vehículo solo.

- 50 La figura 37 muestra mediciones del volumen tumoral promedio in vivo (modelo de ratón beige SCID con trasplante de la almohadilla adiposa mamaria) en tumores derivados de OVCAR-3 después del tratamiento con varios anticuerpos 3A5 quiméricos conjugados a toxina, anticuerpos de control o vehículo solo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDASI. Definiciones

[0029] Los términos “polipéptido TAT” y “TAT” tal como se utilizan aquí y cuando va seguida inmediatamente por una designación numérica, se refieren a varios polipéptidos, en los que la designación completa (es decir, TAT/número) se refiere a secuencias de polipéptidos específicas tal como se describen aquí. Los términos “polipéptido TAT/número” y “TAT/número” donde el término “número” se proporciona como una designación numérica real tal como se utiliza aquí, comprenden polipéptidos de secuencia nativa, variantes de polipéptidos y fragmentos de polipéptidos de secuencia nativa y variantes de polipéptidos (que se definen posteriormente aquí). Los polipéptidos TAT descritos en la presente invención se pueden aislar de un conjunto de fuentes, tales como de tipos de tejido humano o de otras fuentes, o se pueden preparar mediante métodos recombinantes o sintéticos. El término “polipéptido TAT” se refiere a cada polipéptido TAT/número individual descrito aquí. Todas las descripciones en esta memoria que se refieren al “polipéptido TAT” se refieren a cada uno de los polipéptidos individualmente, así como de manera conjunta. Por ejemplo, las descripciones de la preparación, purificación, derivación, formación de anticuerpos a o contra, la formación de oligopéptidos de unión a TAT a o contra, la formación de moléculas orgánicas de unión a TAT a o contra, la administración de, composiciones que contienen, el tratamiento de una enfermedad con, etc., se refieren a cada polipéptido de la invención individualmente. El término “polipéptido TAT” también incluye variantes de polipéptidos TAT/número descritos aquí.

[0030] Un “polipéptido TAT de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido TAT derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos TAT de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. El término “polipéptido TAT de secuencia nativa” abarca específicamente las formas truncadas o secretadas naturales del polipéptido TAT específico (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas (“spliced”) alternativamente) y variantes alélicas naturales del polipéptido. En varias realizaciones de la invención, los polipéptidos TAT de secuencia nativa descritos aquí son polipéptidos de secuencia nativa madura o de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa que se muestran en las figuras acompañantes. Los codones de inicio y parada (si se indican) se muestran en negrita y subrayados en las figuras. Los residuos de ácidos nucleicos indicados como una “N” en las figuras acompañantes son cualquier residuo de ácido nucleico. Sin embargo, mientras que se muestra que los polipéptidos TAT descritos en las figuras acompañantes se inician con los residuos de metionina denominados aquí como posición 1 de aminoácido en las figuras, es concebible y posible que otros residuos de metionina localizados cadena arriba o cadena abajo de la posición 1 de aminoácidos en las figuras puedan utilizarse como el residuo de aminoácido de partida de los polipéptidos TAT.

[0031] El “dominio extracelular” o “ECD” del polipéptido TAT se refiere a una forma del polipéptido TAT que está libre esencialmente de los dominios transmembrana y citoplasmático. Generalmente, un ECD del polipéptido TAT tendrá menos del 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplasmático y preferiblemente, tendrá menos del 0,5% de dichos dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos TAT de la presente invención se identifican siguiendo los criterios utilizados habitualmente en la técnica para la identificación de ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero muy probablemente, en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio tal como inicialmente se identificó aquí. Opcionalmente, por tanto, un dominio extracelular de un polipéptido TAT puede contener desde aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquier extremo de los límites del dominio transmembrana/dominio extracelular tal como se identifica en los Ejemplos o la memoria y dichos polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y el ácido nucleico que los codifica, están contemplados por la presente invención.

[0032] La localización aproximada de los “péptidos señal” de los diversos polipéptidos TAT descritos aquí se puede mostrar en la presente memoria y/o las figuras acompañantes. Cabe indicar, sin embargo, que el límite C-terminal de un péptido señal puede variar, pero muy probablemente, en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquiera de los extremos del límite C-terminal del péptido señal tal como se identificó inicialmente aquí, donde el límite C-terminal del péptido señal puede identificarse según el criterio utilizado de forma rutinaria en la técnica para identificar ese tipo de elemento de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen y et al., Prot Eng, 10:1-6 (1997) y von Heinje y et al., Nucl Acids Res, 14:4683-4690 (1986)). Además, también se ha reconocido, que, en algunos casos, la división de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es totalmente uniforme, dando como resultado más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, cuando el péptido señal se divide en no más de aproximadamente 5 aminoácidos por cualquier extremo del límite C-terminal del péptido señal identificado aquí, y los polinucleótidos que los codifican, están contemplados por la presente invención.

[0033] “Variante de polipéptido TAT” significa un polipéptido TAT, preferiblemente un polipéptido TAT activo, tal como se define aquí que tiene por lo menos aproximadamente el 80% de identidad en la secuencia con una secuencia de polipéptido TAT de secuencia nativa de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de polipéptido TAT que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAT, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido TAT de longitud completa tal como se describe aquí (tales como las codificadas por un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificante completa para un polipéptido TAT de longitud completa).

Dichas variantes de polipéptido TAT incluyen, por ejemplo, los polipéptidos TAT en donde uno o más residuos de aminoácido se añaden, o eliminan, en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Generalmente, una variante de polipéptido TAT tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de un polipéptido TAT de secuencia nativa de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de polipéptido TAT que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAT, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de polipéptido TAT de longitud completa tal como se describe aquí. Generalmente, los polipéptidos variantes de TAT tienen una longitud de por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos, alternativamente de por lo menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 aminoácidos de longitud, o más. Opcionalmente, los polipéptidos variantes de TAT tendrán no más de una sustitución de aminoácido conservativo en comparación con la secuencia de polipéptido TAT nativa, alternativamente no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10 sustituciones de aminoácido conservativo en comparación con la secuencia de polipéptido TAT nativa.

[0034] El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias del polipéptido TAT identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido TAT específica, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

[0035] En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para la comparación de secuencia de aminoácidos, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizando este procedimiento, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada “Proteína de comparación” con la secuencia de aminoácidos denominada “TAT”, donde “TAT” representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contra el que el polipéptido “TAT” hipotético de interés, “Proteína de comparación” representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contra el que se compara el “polipéptido TAT” de interés, y “X”, “Y” y “Z” cada uno representa residuos de aminoácidos hipotéticos diferentes. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizados aquí se obtienen tal como se describe en párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

[0036] El “polinucleótido variante de TAT” o “secuencia de ácidos nucleicos variante de TAT” significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido TAT, preferiblemente un polipéptido TAT activo, tal y como se define aquí, y que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido TAT de secuencia nativa y de longitud completa tal y como se describe aquí, una secuencia de polipéptido TAT de secuencia nativa y de longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAT, con o sin el

péptido señal, tal y como se describe aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido TAT de longitud completa tal y como se describe aquí (tales como las codificadas por un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificante completa para un polipéptido TAT de longitud completa). Habitualmente, un polinucleótido variante de TAT tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido TAT de secuencia nativa y de longitud completa tal y como se describe aquí, una secuencia de polipéptido TAT de secuencia nativa y longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAT, con o sin el péptido señal, tal y como se describe aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido TAT de longitud completa tal y como se describe aquí. Las variantes no comprenden la secuencia de nucleótidos nativa.

[0037] Habitualmente, los polinucleótidos variantes de TAT tienen por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ó 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos referenciada más o menos un 10% de esa longitud referenciada.

[0038] El "porcentaje (%)" de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos" con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el TAT identificadas aquí se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica TAT de interés, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, o Megalign (DNASTAR). Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 siguiente se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

[0039] En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para las comparaciones de secuencia de ácidos nucleicos, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } W/Z$$

donde W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de D a C. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, las Tablas 4 y 5 demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de ácidos nucleicos denominada "ADN de comparación" con la secuencia de ácidos nucleicos denominada "TAT-DNA", donde "TAT-DNA" representa una secuencia de ácidos nucleicos hipotética que codifica TAT de interés, "ADN de comparación", representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico contra la que se compara la molécula de ácido nucleico "TAT-DNA" de interés, y "N", "L" y "V" cada uno representa nucleótidos hipotéticos. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores del % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos utilizados aquí se obtienen tal como se describe en párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

[0040] En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes de TAT son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido TAT y que son capaces de hibridarse, preferiblemente bajo condiciones de hibridación y lavado astringentes, a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido TAT de longitud completa tal como se

describe aquí. Los polipéptidos variantes de TAT pueden ser aquéllos codificados por un polinucleótido variante de TAT.

[0041] El término “región codificante de longitud completa” cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico que codifica un polipéptido TAT se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido TAT de longitud completa de la invención (que se muestra a menudo entre los codones de inicio y parada, incluyendo ambos, en las figuras que se acompañan). El término “región codificante de longitud completa” cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico depositado en ATCC se refiere a la parte del ADNc que codifica el polipéptido TAT que se inserta en el vector depositado con la ATCC (que se muestra a menudo entre los codones de inicio y parada, incluyendo ambos, en las figuras que se acompañan).

[0042] El término “aislado”, cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos TAT descritos aquí, significa polipéptidos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos de diagnóstico o terapéutico para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del polipéptido TAT no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0043] Un ácido nucleico “aislado” que codifica un polipéptido TAT u otro ácido nucleico que codifica un polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido aislada es una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido se diferencian de la molécula de ácido nucleico específica que codifica un polipéptido tal y como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido incluye moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

[0044] El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0045] Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se utilizan los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

[0046] La “astringencia” de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación más correcta, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que se puede utilizar. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más astringentes, mientras que temperaturas inferiores no tanto. Para detalles adicionales y explicaciones de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0047] Condiciones astringentes” o “condiciones de astringencia elevada”, tal y como se definen en la presente invención, se pueden identificar por aquéllas que: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v)

con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) una hibridación durante la noche en una solución que utiliza formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con un lavado de 10 min a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) seguido de un lavado de astringencia elevada de 10 min que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

[0048] Las “condiciones moderadamente astringentes” se pueden identificar tal y como se describen en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia sabrá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. necesarias para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

[0049] El término “epítipo etiquetado”, cuando se utiliza en la presente invención, se refiere a un polipéptido químico que comprende un polipéptido TAT o un anticuerpo anti-TAT fusionado a un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiqueta tiene residuos suficientes para proporcionar un epítipo contra el que se puede fabricar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiere en la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

[0050] “Activo” o “actividad” para los objetivos de la presente invención se refiere a una forma o formas de un polipéptido TAT que retiene una actividad biológica y/o inmunológica de un polipéptido TAT nativo o natural, donde la actividad “biológica” se refiere a una función biológica (inhibidora o estimuladora) provocada por un polipéptido TAT nativo o natural que es diferente de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que se encuentra en un polipéptido TAT nativo o natural y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que se encuentra en un polipéptido TAT nativo o natural.

[0051] El término “antagonista” se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido nativo TAT descrito aquí. De manera similar, el término “agonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que mimetiza una actividad biológica de un polipéptido TAT nativo descrito aquí. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes en la secuencia de aminoácidos de polipéptidos TAT nativos, péptidos, oligonucleótidos no codificante, moléculas orgánicas pequeñas, etc., ya sean agonistas o antagonistas. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido TAT pueden comprender poner en contacto un polipéptido TAT con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido TAT.

[0052] “Tratar” o “tratamiento” o “alivio” se refieren a tanto un tratamiento terapéutico como con medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno patológico reconocido. Los necesitados del tratamiento incluyen aquéllos que ya padecen el trastorno, así como aquéllos propensos a padecer el trastorno o aquéllos a los que debe prevenirse el trastorno. Un sujeto o mamífero es “tratado” satisfactoriamente para un cáncer que expresa el polipéptido TAT si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT según los métodos de la presente invención, el paciente muestra una reducción observable y/o medible o ausencia de uno o más de los siguientes: reducción en el número de células cancerosas o ausencia de células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferiblemente detención) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo la extensión del cáncer a tejido blando y hueso; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferiblemente detención) de la metástasis tumoral; inhibición, en cierto grado, del crecimiento tumoral; y/o alivio, en cierto grado, de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas, y mejora en cuestiones de calidad de vida. Siempre que el anticuerpo anti-TAT o el oligopéptido de unión a TAT puedan prevenir el crecimiento y/o la citólisis de células cancerosas existentes, pueden ser citostáticos o citotóxicos. La reducción de estos signos o síntomas también puede ser sentida por el paciente.

[0053] Los parámetros anteriores para evaluar un tratamiento satisfactorio y una mejora en la enfermedad son fácilmente medibles mediante procedimientos de rutina familiares para el médico. Para la terapia contra el cáncer, se puede medir la eficacia, por ejemplo, mediante la valoración del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o la determinación de la tasa de respuesta (RR). La metástasis se puede determinar mediante tests de

estadificación y mediante escaneo óseo y tests de los niveles de calcio y otras enzimas para determinar la expansión hacia los huesos. Los escaneos CT también se pueden realizar para buscar la expansión hacia la pelvis y los nódulos linfáticos en el área. Los rayos X del pecho y la medición de los niveles de enzimas hepáticas mediante métodos conocidos se utilizan para buscar metástasis hacia pulmones e hígado, respectivamente. Otros métodos de rutina para monitorizar la enfermedad incluyen ultrasonografía transrectal (TRUS) y biopsia con aguja transrectal (TRNB).

[0054] Administración “crónica” se refiere a la administración del agente o agentes de un modo continuo en oposición a un modo agudo, para mantener el efecto (actividad) terapéutica inicial durante un periodo de tiempo largo. Administración “intermitente” es el tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que es más bien cíclico por naturaleza.

[0055] El término “mamífero” con el propósito de tratamiento, o alivio de los síntomas o diagnóstico del cáncer, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo el hombre, animales domésticos y de granja, y animales del zoo, competiciones deportivas o de compañía, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos etc. Preferiblemente, el mamífero es el hombre.

[0056] La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (a la vez) y la administración consecutiva en cualquier orden.

[0057] “Portadores”, tal como se utiliza aquí, incluyen los potadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, que no son tóxicos para la célula o para el mamífero que se expone a los mismos en las dosificaciones y concentraciones utilizadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Ejemplos de portadores aceptables fisiológicamente incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferiores a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como la glicina, la glutamina, la asparagina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, la manosa, o las dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

[0058] Por “fase sólida” o “soporte sólido” se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir o unir un anticuerpo, un oligonucleótido de unión a TAT o una molécula orgánica de unión a TAT de la presente invención. Ejemplos de fases sólidas comprendidas en la presente invención incluyen aquellas formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), de polisacáridos (por ejemplo, agarosa), de poliácridamidas, de poliestireno, de polivinil alcohol y de siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tal como las descritas en la patente de Estados Unidos no. 4.275.149.

[0059] Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como un polipéptido TAT, un anticuerpo para el mismo o un oligopéptido de unión a TAT) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

[0060] Una molécula “pequeña” o molécula orgánica “pequeña” se define en la presente invención por tener un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

[0061] Una “cantidad eficaz” de un polipéptido, anticuerpo, oligopéptido de unión a TAT, molécula orgánica de unión a TAT o un agonista o antagonista de los mismos tal como se describe aquí, es una cantidad suficiente para llevar a cabo un objetivo específicamente indicado. Una “cantidad eficaz” puede determinarse empíricamente y de forma rutinaria, en relación al objetivo indicado.

[0062] El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, oligopéptido de unión a TAT, molécula orgánica de unión a TAT u otro fármaco eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar, en cierto grado, uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición de “tratamiento” en la presente invención. Siempre que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o la citólisis de células cancerosas existentes, puede ser citostático o citotóxico.

[0063] Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un anticuerpo anti-TAT, polipéptido TAT, oligopéptido de unión a TAT, o molécula orgánica de unión a TAT es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, las células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un anticuerpo anti-TAT, polipéptido TAT, oligopéptido de unión a TAT, o molécula orgánica de unión a TAT con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y de una

manera rutinaria.

[0064] Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-TAT, polipéptido TAT, oligopéptido de unión a TAT, o molécula orgánica de unión a TAT es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo las células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-TAT, polipéptido TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y de una manera rutinaria.

[0065] El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-TAT individuales (incluyendo agonista, antagonista, y anticuerpos neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-TAT con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-TAT de cadena única, y fragmentos de anticuerpos anti-TAT (ver a continuación), siempre y cuando muestren la actividad biológica o inmunológica deseadas. El término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza indistintamente con el anticuerpo de la presente invención.

[0066] Un "anticuerpo aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, se purificará el anticuerpo (1) en más de un 95% en peso del anticuerpo determinado por el método de Lowry, y aún más preferiblemente en más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0067] La unidad básica del anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5, la unidad heterotetramérica básica junto con un polipéptido adicional denominado cadena J y, por tanto, contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgGs, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.00 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro que dependen del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente separados. Cada cadena H tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª Edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.

[0068] La cadena L de cualquier especie vertebrada se puede asignar a uno de los dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen las cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases en base a diferencias relativamente menores en la secuencia y la función de C_H , por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

[0069] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo del tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones armazón ("framework") (FRs) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una de 9 a 12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas de manera próxima mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la

citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0070] El término "anticuerpo monoclonal", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se pueden sintetizar sin estar contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención se pueden fabricar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas, animales o vegetales eucariotas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

[0071] Entre los anticuerpos monoclonales de la presente invención se incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (véase, Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente invención incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del viejo Mundo, Simio, etc) y secuencias de la región constante humana.

[0072] Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende un sitio de unión a antígeno, así como un C_L y por lo menos los dominios constantes de cadena pesada C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes en la secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

[0073] Los "fragmentos de anticuerpos" comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diabodies; anticuerpos lineales (véase la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0074] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento de Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, presenta un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento $F(ab')_2$ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos de Fab unidos por puentes disulfuro que tienen una actividad de unión a antígeno divalente y aún es capaz de reticular con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de una serie de residuos en el extremo carboxi terminal del dominio C_{H1} que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención para Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes transportan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0075] El fragmento Fc comprende las partes carboxi terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas mediante enlaces disulfuro. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan mediante las secuencias en la región Fc, cuya región es también la parte reconocida por receptores Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

[0076] "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha no covalente. A partir del pliegue de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada una de las cadenas H y L) que contribuyen con los residuos de aminoácidos para la unión a antígeno y que confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDRs específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

[0077] "Fv de cadena única", también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo conectados en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *infra*.

[0078] El término "diabodies" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con enlazadores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L , de manera que se consigue el emparejamiento de los dominios V entre cadenas, pero no intracadenas, dando lugar a un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos de sFv de entrecruzamiento ("crossover"), donde los fragmentos V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

[0079] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) donde los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región armazón ("framework") (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

[0080] Un "anticuerpo dependiente de especie", por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE humano de mamífero, es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie mamífera que la que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (K_d) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} y lo más preferible no más de aproximadamente 1×10^{-9} M), pero presenta una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humana que es por lo menos aproximadamente 50 veces, o por lo menos aproximadamente 500 veces, o por lo menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano.

[0081] El término "residuo de dominio variable que se enumera como en Kabat" o "posición de aminoácido que se enumera como en Kabat", y variaciones de los mismos, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondiente a un recorte o una inserción en una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción de un único aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, los residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de residuos Kabat se puede determinar para un anticuerpo determinado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia enumerada Kabat "estándar".

[0082] La frase "sustancialmente similar" o "sustancialmente el mismo/la misma", tal como se utiliza aquí, indica un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo de la presente invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación), de manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene una significancia biológica y/o estadística escasa o nula en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de K_d). La diferencia entre dichos dos valores es preferiblemente inferior a aproximadamente el 50%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 40%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 30%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 20%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 10% en función del valor para el anticuerpo de referencia/comparación.

[0083] "Afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A

menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza aquí, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de la pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y se puede representar en general por la constante de disociación (K_d). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos aquí. Los anticuerpos de baja afinidad se unen en general a antígenos lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que anticuerpos de afinidad elevada se unen en general a antígenos más rápidamente y tienden a permanecer unidos más tiempo. En la técnica se conocen diversos métodos de medición de la afinidad de unión y cualquiera se puede utilizar para los objetivos de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas específicas.

[0084] En una realización, " K_d " o "el valor K_d " según la presente invención se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con una versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno tal como se describe en el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fabs por el antígeno mediante el equilibrio de Fab con una concentración mínima de antígeno marcado (^{125}I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, a continuación se captura el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) se recubren toda la noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquea con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM de [^{125}I]-antígeno se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistentes con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). El Fab de interés se incuba a continuación durante toda la noche; aunque sin embargo la incubación puede continuar durante un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se extrae la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Cuando se han secado las placas, se añaden 150 μl / pocillo de centelleador (MicroScint-20; Packard), y se recuentan las placas en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que produce menos o igual a un 20% de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva. Según otra realización, K_d o el valor de K_d se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 $\mu\text{g/ml}$ (~0,2 μM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 $\mu\text{l/minuto}$ para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 $\mu\text{l/min}$. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Si la velocidad "on" supera $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad "on" se puede determinar utilizando una técnica de "quenching" fluorescente que mide el incremento o descenso en la intensidad de emisión por fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo interrumpido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta de agitación.

[0085] Una "velocidad on" o "velocidad de asociación o " k_{on} " según la presente invención también se puede determinar con la misma técnica de resonancia de plasmón superficial descrita anteriormente utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 $\mu\text{g/ml}$ (~0,2 μM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 $\mu\text{l/minuto}$ para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 $\mu\text{l/min}$. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. sin embargo, si la velocidad "on" supera $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad "on" se puede determinar utilizando una técnica de "quenching" fluorescente que mide el incremento o descenso en la intensidad de emisión por fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso

de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo interrumpido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cuveta de agitación. "Kd" o "el valor Kd" según la presente invención se mide en una realización mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab del anticuerpo y la molécula de antígeno tal como se describe en el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fabs por el antígeno mediante el equilibrio de Fab con una concentración mínima de antígeno marcado (^{125}I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, a continuación se captura el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) se recubren toda la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquea con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM de [^{125}I]-antígeno se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (consistentes con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). El Fab de interés se incuba a continuación durante toda la noche; aunque sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se extrae la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Cuando se han secado las placas, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MicroScint-20; Packard), y se recuentan las placas en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que producen menos o igual a un 20% de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva. Según otra realización, Kd o el valor de Kd se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (kon) y velocidades de disociación (koff) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la proporción koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Si la velocidad "on" supera $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad "on" se puede determinar utilizando una técnica de "quenching" fluorescente que mide el incremento o descenso en la intensidad de emisión por fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo interrumpido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cuveta de agitación.

[0086] En una realización, una "velocidad on" o "velocidad de asociación o "kon" según la presente invención también se determina con la misma técnica de resonancia de plasmón superficial descrita anteriormente utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (kon) y velocidades de disociación (koff) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la proporción koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Sin embargo, si la velocidad "on" supera $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad "on" se puede determinar utilizando una técnica de "quenching" fluorescente que mide el incremento o descenso en la intensidad de emisión por fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo interrumpido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cuveta de agitación.

[0087] La frase "sustancialmente reducido/a" o "sustancialmente diferente", tal como se utiliza aquí, indica un grado suficientemente elevado de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo

de la presente invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación), de manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores es de significancia estadística en el contexto de la característica biológica medida mediante dichos valores (por ejemplo, valores de Kd, respuesta HAMA). La diferencia ente dichos dos valores es preferiblemente superior a aproximadamente un 10%, preferiblemente superior a aproximadamente un 20%, preferiblemente superior a aproximadamente un 30%, preferiblemente superior a aproximadamente un 40%, preferiblemente superior a aproximadamente un 50% en función del valor del anticuerpo de referencia/comparación.

[0088] Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al que se puede unir selectivamente un anticuerpo. El antígeno diana puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto natural o sintético. Preferiblemente, el antígeno diana es un polipéptido. Un "armazón humano aceptor" para los objetivos de la presente invención es un armazón (framework) que comprende la secuencia de aminoácidos de un armazón VL o VH derivado de un armazón de inmunoglobulina humana, o de un armazón de consenso humano. Un armazón humano aceptor "derivado de" un armazón de inmunoglobulina humana o armazón de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos. Cuando los cambios preexistentes de aminoácidos están presentes, preferiblemente no más de 5 y preferiblemente 4 o menos, o 3 o menos cambios preexistentes de aminoácidos están presentes. Cuando los cambios preexistentes de aminoácidos están presentes en una VH, preferiblemente estos cambios son sólo en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos en esas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, el armazón humano aceptor de VL es idéntico en la secuencia con la secuencia del armazón de inmunoglobulina humana VL o una secuencia de armazón de consenso humana.

[0089] Los anticuerpos de la presente invención puede ser capaz de competir por la unión al mismo epítipo unido al unirse a un segundo anticuerpo. Se considera que los anticuerpos monoclonales comparten el "mismo epítipo" si cada uno bloquea la unión del otro en un 40% o más a la misma concentración de anticuerpo en un análisis de unión por competición de anticuerpos estándar in vitro.

[0090] Un "armazón de consenso humano" es un armazón que representa el residuo de aminoácidos más habitual en una selección de secuencias armazón VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al. En una realización, para la VL, el subgrupo es subgrupo kappa I como en Kabat et al. En una realización, para la VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat et al.

[0091] Un "armazón de consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III de la cadena pesada variable de Kabat et al.

[0092] A "armazón de consenso del subgrupo I de VL" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa de la cadena ligera variable de Kabat et al.

[0093] Un "armazón humano no modificado" es un armazón humano que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el armazón humano aceptor, por ejemplo, que carece de la sustitución o sustituciones de aminoácidos humanos en no humanos en el armazón humano aceptor.

[0094] Una "región hipervariable alterada" para los objetivos de la presente invención es una región hipervariable que comprende una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, de una a aproximadamente 16) en la misma.

[0095] Un "región hipervariable no modificada" para los objetivos de la presente invención es una región hipervariable que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo no humano del que derivaba, es decir una que carece de una o más sustituciones de aminoácidos en la misma.

[0096] El término "región hipervariable", "HVR", o "HV", cuando se utiliza aquí, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). Se utilizan un conjunto de delineaciones de regiones hipervariables y están comprendidos aquí. Las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más utilizadas habitualmente (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en cambio a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras de cristales complejos disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación. A menos que se indique lo contrario, se utilizará la numeración de Kabat. Las localizaciones de la región variable son en general las siguientes: aminoácidos 24-34 (HVR-L1), aminoácidos 49-56 (HVR-L2), aminoácidos 89-97 (HVRL3), aminoácidos 26-35A (HVR-H1), aminoácidos 49-65 (HVR-H2), y aminoácidos 93-102 (HVR-H3).

[0097] Las regiones hipervariables también pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" siguientes: aminoácidos 24-36 (L1), y los aminoácidos 46-56 (L2) en la VL. Los residuos de dominio variable se enumeran

según Kabat et al., supra para cada una de estas definiciones.

[0098] Residuos de "armazón" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se define aquí.

5 **[0099]** Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha fabricado utilizando cualquiera de las técnicas para fabricar anticuerpos humanos tal como se describe aquí. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humano.

10 **[0100]** Un anticuerpo "madurado para afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más de CEDR que dan lugar a una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esta alteración o alteraciones. Los anticuerpos madurados para afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados para afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración para afinidad por mezcla de los dominios de VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los residuos de CDR y/o armazón se describe por: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

[0101] Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno que se une. Los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

20 **[0102]** Un "oligopéptido de unión a TAT" es un oligopéptido que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAT tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a TAT se pueden sintetizar químicamente utilizando una metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a TAT tienen habitualmente por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 25 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAT tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a TAT se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas bien conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; Publicación PCT Nos. WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 3998-4002 (1984); Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 178-182 (1985); Geysen et al., in *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149 (1986); Geysen et al., *J. Immunol. Meth.*, 102: 259-274 (1987); Schoofs et al., *J. Immunol.*, 140: 611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6378; Lowman, H.B. et al. (1991) *Biochemistry*, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991). *J. Mol. Biol.*, 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8363, y Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2: 668).

40 **[0103]** Una "molécula orgánica de unión a TAT" es una molécula orgánica diferente de un oligopéptido o anticuerpo tal como se define aquí, que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAT tal como se describe aquí. Las moléculas orgánicas de unión a TAT se pueden identificar y sintetizar químicamente utilizando metodología conocida (véase, por ejemplo, Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a TAT tienen habitualmente menos de aproximadamente 2000 daltons de tamaño, 45 alternativamente menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 ó 200 daltons de tamaño, donde dichas moléculas orgánicas que son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAT tal como se describe aquí, se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas bien conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, 50 Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585).

[0104] Un anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica "que se une" a un antígeno de interés, por ejemplo, un polipéptido antígeno diana asociado a un tumor, es aquel que se une al antígeno con suficiente afinidad, de manera que el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en el reconocimiento de una célula o tejido que expresan el antígeno, y no reacciona significativamente de forma cruzada con otras proteínas. En dichas realizaciones, el grado de unión del anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica a una proteína "no diana" será inferior a aproximadamente un 10% de la unión del anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica a su proteína diana particular tal como se determina mediante un análisis mediante separador celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto a la unión de un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una molécula diana, el término "unión específica" o "que se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular 60

significa una unión que es diferente de forma medible de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante la competición con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, se indica unión específica si la unión de la diana marcada a una sonda es inhibida competitivamente por un exceso de diana no marcada. El término "unión específica" o "que se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular tal como se utiliza aquí se pueden mostrar, por ejemplo, mediante una molécula que tiene una K_d para la diana de por lo menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-12} M, o superior. En una realización, el término "unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido particular sin unirse específicamente a cualquier otro polipéptido o epítipo en polipéptido.

[0105] Un anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica que "inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan un polipéptido TAT" o un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "inhibidora del crecimiento" son aquellos que dan lugar a una inhibición de crecimiento medible de las células cancerosas que expresan o sobreexpresan el polipéptido TAT apropiado. El polipéptido TAT puede ser un polipéptido transmembrana expresado en la superficie de una célula cancerosa o puede ser un polipéptido que es producido y secretado por una célula cancerosa. Los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos o moléculas orgánicas inhibidoras del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de las células tumorales que expresan TAT en más de un 20%, preferiblemente de aproximadamente un 20% a aproximadamente un 50% e incluso, más preferiblemente, en más de un 50%, (por ejemplo, de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 100%), en comparación con el control apropiado, siendo habitualmente el control células tumorales no tratadas con el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a analizar. En una realización, la inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 $\mu\text{g/ml}$ o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de las células tumorales in vivo se puede determinar de varias maneras, tales como las descritas en la sección de Ejemplos Experimentales siguiente. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento in vivo si la administración del anticuerpo anti-TAT a aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da lugar a la reducción en el tamaño tumoral o proliferación de células tumorales en aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente en aproximadamente 5 a 30 días.

[0106] Un anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica que "induce apoptosis" es aquel que induce la muerte celular programada determinada mediante la unión de annexina V, la fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplasmático, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula es normalmente aquella que sobreexpresa un polipéptido TAT. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de próstata, mama, ovario, estómago, endometrio, pulmón, riñón, colon, colorrectal, vejiga. Existen varios métodos disponibles para evaluar los eventos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de la fosfatidil serina (PS) se puede medir mediante la unión a annexina; la fragmentación de ADN se puede evaluar a través del "laddering" del ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación de ADN se pueden evaluar mediante cualquier aumento en células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo, el oligopéptido u otra molécula orgánica que induce la apoptosis es aquel que da lugar de aproximadamente 2 a 50 veces, preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 veces, y aún más preferiblemente de aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de unión a annexina en relación a célula no tratada en un ensayo de unión a annexina.

[0107] Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de una variante en la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento; la unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; subregulación de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y la activación de células B.

[0108] "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refieren a una forma de citotoxicidad en que la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas ("killer") naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta el antígeno y, posteriormente, eliminan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y son absolutamente necesarias para dicha eliminación. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan Fc γ RIII solo, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991). Para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo ADCC in vitro, tal como el descrito en las patentes de Estados Unidos 5.500.362 ó 5.821.337. Células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células

mononucleares de sangre periférica (PBMK) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede determinar in vivo, por ejemplo en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et al. PNAS (USA), 95:652-656 (1998).

[0109] Los términos “receptor Fc” o “FcR” describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. La FcR preferida es una FcR humana de secuencia nativa. Además, una FcR preferida es aquella que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas (“spliced”) de estos receptores. Los receptores FcγRIIIc incluyen FcγRIIA (un “receptor de activación”) y FcγRIIB (un “receptor de inhibición”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (revisado en Daëron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)). Los FcRs se revisan en Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods, 4:25-34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están comprendidos por el término “FcR” aquí. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol., 117:587 (1976); y Kim et al., J. Immunol., 24:249 (1994)).

[0110] “Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan por lo menos FcγRII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMK), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMKs y NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

[0111] “Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refieren a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación del mecanismo de complemento clásico se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afin. Para determinar la activación del complemento se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

[0112] Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores linfoides. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de célula escamosa (por ejemplo, cáncer de célula escamosa epitelial), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, mieloma múltiple y linfoma de células B, cáncer de cerebro, así como cáncer de cabeza y cuello, y las metástasis asociadas.

[0113] Los términos “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación anormal de células. En una realización, el trastorno proliferativo celular es el cáncer.

[0114] “Tumor”, tal como se utiliza aquí, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, tanto malignas como benignas y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

[0115] Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que “induce la muerte celular” es aquel que provoca que una célula viable se convierta en no viable. La célula es aquella que expresa un polipéptido TAT, preferiblemente una célula que sobreexpresa un polipéptido TAT en comparación con una célula normal del mismo tipo de tejido. El polipéptido TAT puede ser un polipéptido transmembrana expresado en la superficie de una célula cancerosa o puede ser un polipéptido que es producido y secretado por una célula cancerosa. Preferiblemente, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas o vejiga. La muerte celular in vitro se puede determinar en ausencia de complemento y de células efectoras inmunes para distinguir la muerte celular inducida por la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). De este modo, el ensayo por la muerte celular se puede realizar utilizando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunes. Para determinar si el anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica es capaz de inducir la muerte celular, la pérdida de la integridad de membrana evaluada mediante la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (véase Moore et al. Cytotechnology 17: 1-11 (1995)) o 7AAD se puede evaluar en relación con las células no tratadas. Los anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas que inducen la muerte celular preferidas son aquellos que inducen la captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474.

[0116] Una "célula que expresa TAT" es una célula que expresa un polipéptido TAT endógeno o transfectado en la superficie celular o en una forma secretada. Un "cáncer que expresa TAT" es un cáncer que comprende células que tienen un polipéptido TAT presente en la superficie celular o que producen y secretan un polipéptido TAT. Un "cáncer que expresa TAT" produce opcionalmente niveles suficientes de polipéptido TAT en la superficie de células del mismo, de manera que un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido u otra molécula orgánica se pueden unir al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. En otra realización, un "cáncer que expresa TAT" produce y secreta opcionalmente niveles suficientes de polipéptido TAT, de manera que un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido u otra molécula orgánica antagonistas se pueden unir al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. Con respecto a esto último, el antagonista puede ser un oligonucleótido no codificante que reduce, inhibe o evita la producción y la secreción del polipéptido TAT secretado por células tumorales. Un cáncer que "sobrexprende" un polipéptido TAT es aquel que presenta niveles significativamente más elevados de polipéptido TAT en la superficie celular del mismo, o produce y secreta, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por la amplificación génica o mediante el aumento de la transcripción o la traducción. La sobreexpresión de polipéptido TAT se puede determinar en un ensayo de diagnóstico o pronóstico mediante la evaluación de niveles incrementados de la proteína TAT presente en la superficie de una célula, o secretada por la célula, (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-TAT preparados contra un polipéptido TAT aislado que se puede preparar utilizando tecnología de ADN recombinante a partir de un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido TAT; análisis FACS, etc.). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica el polipéptido TAT o ARNm en la célula, por ejemplo, a través de hibridación in situ fluorescente utilizando una sonda basada en ácidos nucleicos correspondiente a un ácido nucleico que codifica TAT o el complemento del mismo; (FISH; véase WO98/45479 publicada en octubre 1998), técnicas de transferencia Southern, transferencia Northern o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión del polipéptido TAT midiendo el antígeno escindido en un fluido biológico, tal como suero, por ejemplo, utilizando ensayos basados en anticuerpos (véase, también por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4,933,294 concedida el 12 de junio de 1990; WO91/05264 publicada el 18 de abril de 1991; la Patente de estados unidos 5,401,638 concedida el 28 de marzo de 1995; y Sias et al., J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). A parte de los ensayos anteriores, existen varios ensayos in vivo disponibles para el técnico experto. Por ejemplo, se pueden exponer células en el cuerpo del paciente a un anticuerpo que es opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a células en el paciente, por ejemplo, mediante rastreo externo para la radioactividad o mediante el análisis de una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

[0117] Tal como se utiliza aquí, el término "inmuno adhesina", designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden la fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada y que es distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir es "heteróloga"), y de una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina típicamente es una secuencia contigua de aminoácidos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluidos IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0118] La palabra "marcador", cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica para generar anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "marcados". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso del marcador enzimático, pueden catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

[0119] El término "agente citotóxico" tal como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos descritos a continuación. A continuación, se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumorocida causa la destrucción de células tumorales.

[0120] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen los agentes alquilantes tales como la tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN®; los alquilsulfonatos tales como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas tales como la benzodopa, carboquone, meturedopa, y uredopa; las etileniminas y metilamelaminas, incluyendo la altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; las acetogeninas (especialmente la bullatacina y la bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lacona; lapacol; colquicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); la briostatina; la calistatina; el CDC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido

podofílico; teniposide; las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la criptoficina 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongistatina; las mostazas nitrogenadas tales como el clorambucilo, la clornafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el hidrocloreto del óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembichina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida, la mostaza de uracilo; las nitrosureas tales como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina, y la ranimustina; los antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, la caliqueamicina, especialmente la caliqueamicina gammall y la caliqueamicina omegall (véase, por ejemplo, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33:183-186 (1994); la dinemicina, incluyendo la dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo de la neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina cromoproteínas relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (Adriamicina®) (incluyendo la morfolino-doxorubicina, la cianomorfolino-doxorubicina, la 2-pirrolino-doxorubicina y la desoxidoxorubicina), la epirubicina, la esorubicina, la idarubicina, la marcelomicina, las mitomicinas tales como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomina, la potfiomicina, la puomicina, la quelamicina, la rodorubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la zinostatina, la zorubicina; los anti-metabolitos tales como el metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); los análogos del ácido fólico tales como la denopterina, el metotrexato, la pteropterina, el trimetrexato; los análogos de purina tales como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiampirina, la tioguanina; los análogos de pirimidina tales como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la didesoxiuridina, la doxilfluridina, la enocitabina, la floxuridina; los andrógenos tales como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitostanol, la mepitostana, la testolactona; los anti-adrenales tales como la aminoglutetimida, el mitotano, el trilostano; los rellenos de ácido fólico tales como el ácido fólico; la aceglatona; el glicósido de aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucilo; el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; la elfomitina; el acetato de eliptinio; una epotilona; el etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxurea; el lentinano; la lonidainina; los maitansinoides tales como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; la pentostatina; el fenameto; la pirarubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidrazida; la procarbazona; el complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); la razoxana; la rizoxina; el sizofirano; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaziquona; la 2,2',2''-trichlorotrietilamina; los tricetecenos (especialmente la toxina T-2, la verracurina A, la roridina A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINA®, FILDESINA®); la dacarbazina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromano; la gacitosina; el arabinósido ("Ara-C"); la tiotepa; los taxoides, por ejemplo, el paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), formulación en nanopartículas de paclitaxel diseñado en albúmina, libre de Cremóforos ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y el doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); el cloranbucilo; la gemcitabina (Gemzar®); la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metotrexato; los análogos de platino tales como el cisplatino y carboplatino; la vinblastina (VELBAN®); el platino; el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; la vinorelbina (Navelbine®); la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides tales como el ácido retinoico; la capecitabina (XELODA®); y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviación para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviación para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

[0121] También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden inducir el crecimiento del cáncer y, a menudo, en forma de tratamiento sistémico o de todo el cuerpo. Pueden ser hormonas en sí. Entre los ejemplos se incluyen antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógeno selectivos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX® tamoxifeno), EVTSTA® raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® toremifeno; anti-progesteronas; subreguladores del receptor de estrógeno (ERDs); agentes que actúan para suprimir o desactivar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH), tales como LUPRON® y acetato de leuprolide ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazolas, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bifosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID®, o risedronato ACTONEL®; así como troxacitabina (un análogo del 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en mecanismos de señalización implicados en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas, tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas con terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAPID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina quinasa dual de ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los

anteriores.

[0122] Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa TAT, *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan TAT en la fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Algunos bloqueadores clásicos de fase M incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que interrumpen G1 también afectan a la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloroetamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn y Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami et al., (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerosos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos mediante la prevención de la despolimerización, lo que da lugar a la inhibición de la mitosis en células.

[0123] "Doxorubicina" es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil) oxil]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.

[0124] El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Algunos ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento, tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidal; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteínica (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento I y II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tales como interferón- α , β , y γ ; factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β , y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (LK). Tal y como se utiliza en la presente invención, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

[0125] El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de los productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, utilización, dosis, administración, contraindicaciones y/o avisos con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

Tabla 1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int _day[26][26] = {
/*  A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ {_M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT         3      /* value of matching bases */
#define DMIS         0      /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0        8      /* penalty for a gap */
#define DINS1        1      /* penalty per base */
#define PINS0        8      /* penalty for a gap */
#define PINS1        4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int            score;      /* score at last jmp */
    long           offset;     /* offset of prev block */
    short          ijmp;       /* current jmp index */
    struct jmp      jp;        /* list of jmps */
};

struct path {
    int            spc;        /* number of leading spaces */
    short          n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
    int            x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char              *ofile;      /* output file name */
char              *namex[2];   /* seq names: getseqs() */
char              *prog;       /* prog name for err msgs */
char              *seqx[2];    /* seqs: getseqs() */
int               dmax;        /* best diag: nw() */
int               dmax0;       /* final diag */
int               dna;         /* set if dna: main() */
int               endgaps;     /* set if penalizing end gaps */
int               gapx, gapy;   /* total gaps in seqs */
int               len0, len1;   /* seq lens */
int               ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int               smax;        /* max score: nw() */
int               *xbm;        /* bitmap for matching */
long              offset;      /* current offset in jmp file */
struct diag       *dx;         /* holds diagonals */
struct path       pp[2];       /* holds path for seqs */

char              *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char              *getseq(), *g_calloc();

```

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
int      ac;
char     *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;          /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";  /* output file */

    nw0;                  /* fill in the matrix, get the possible jumps */
    readjumps0;           /* get the actual jumps */
    print0;               /* print stats, alignment */

    cleanup(0);           /* unlink any tmp files */
}

```

```

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/

nw()
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int        *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int        ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int        *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int        mis;               /* score for each type */
    int        ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register   id;                 /* diagonal index */
    register   ij;                 /* jmp index */
    register   *col0, *coll;      /* score for curr, last row */
    register   xx, yy;            /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    coll = (int *)g_calloc("to get coll", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;
    /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                coll[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                coll[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            coll[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

nw

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongong del
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */

    id = xx - yy + len1 - 1;
    if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
        col1[yy] = mis;

```

...nw

```

else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
    else {
        col1[yy] = dely[yy];
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejumps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
            dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
            dx[id].jp.x[ij] = xx;
            dx[id].score = dely[yy];
        }
        if (xx == len0 && yy < len1) {
            /* last col
            */
            if (endgaps)
                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
            if (col1[yy] > smax) {
                smax = col1[yy];
                dmax = id;
            }
        }
    }
    if (endgaps && xx < len0)
        col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
    if (col1[yy-1] > smax) {
        smax = col1[yy-1];
        dmax = id;
    }
    tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE   256 /* maximum output line */
#define P_SPC    3    /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

print

...

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
int      lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
int      firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double     pct;
    register   n0, n1;
    register char *p0, *p1;
    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;
    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*((double)nm)/((double)lx);
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

getmat


```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n"); ..
}
static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char  *ps[2];      /* ptr to current element */
static char  *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char  out[2][P_LINE]; /* output line */
static char  star[P_LINE]; /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align0
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;
        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr_align

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;
        more++;
        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

dumpblock

...dumpblock

```

(void) putc('\n', fx);
for (j = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int    ix;    /* index in out[] holding seq line */
{
    char    nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;
    for (pn = nline, i = 0; i < lmax + P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i % 10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0) ? -i : i;
                for (px = pn; j != 10, px--)
                    *px = j % 10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int    ix;
{

```

nums

putline

...putline

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != '\n'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!(*out[0] || (*out[0] == '' && *(po[0]) == ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == '' && *(po[1]) == ')'))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (ldna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

stars

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}
```

stripname

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE    *fj;
int      cleanup();                          /* cleanup tmp file */
long     lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
    int    i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)
    char    *file;    /* file name */
    int     *len;      /* seq len */
{
    char        line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int         natgc, tlen;
    FILE        *fp;
    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

```

cleanup

getseq

...getseq

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dna = natgc > (tlen/3);
return(pseq+4);
}
char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;          /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc;
    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;
    if (!fd) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;

```

g_alloc

readjmps

...readjumps

```

        if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
        }
        else
            break;
    }
    if (i >= JMPS) {
        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }
    if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        if (siz < 0) { /* gap in second seq */
            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + len1 - 1 */
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
            gapy++;
            ngapy -= siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
            i1++;
        }
        else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
            pp[0].n[i0] = siz;
            pp[0].x[i0] = xx;
            gapx++;
            ngapx += siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
            i0++;
        }
    }
    else
        break;
}
/* reverse the order of jumps */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```



```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
```

writejumps

```
writejumps(ix)
{
    int ix;
    char *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}
```

TAT	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXXXXXYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)

% de identidad en la secuencia de aminoácidos =

(el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido TAT) =

5 dividido por 15 = 33,3%

Tabla 3

TAT	XXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXXXXXZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

% de identidad en la secuencia de aminoácidos =

(el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido TAT) =

5 dividido por 10 = 50%

Tabla 4

TAT-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNNNLLLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)

% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos =

(el número de nucleótidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de TAT-DNA) =

6 dividido por 14 = 42,9%

Tabla 5

TAT-DNA	NNNNNNNNNNNN	(Longitud = 12 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNLLLVV	(Longitud = 9 nucleótidos)

% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos =

(el número de nucleótidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de

5 TAT-ADN) =

4 dividido por 12 = 33,3%

II. Composiciones y métodos de la invención

A. Anticuerpos anti-TAT

10 **[0126]** En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos anti-TAT que pueden ser útiles como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. Entre los anticuerpos de ejemplo se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

15 **[0127]** Los anticuerpos policlonales se desarrollan preferiblemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente (especialmente cuando se utilizan péptidos sintéticos) a una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno se puede conjugar a la hemocianina de la lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

20 **[0128]** Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección intradérmica de la solución en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días más tarde los animales sangran y el suero se analiza por el título de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Los conjugados también se pueden producir en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, se utilizan de forma adecuada agentes de agregación, tales como el alumbre, para potenciar la respuesta inmune.

30 2. Anticuerpos monoclonales

[0129] Los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975) o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567).

35 **[0130]** En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmunizan como se ha descrito anteriormente para conseguir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan a continuación con una línea celular de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press. 1986)).

40 **[0131]** Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas (también referidas como compañero de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirán habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

45 **[0132]** Las células de mieloma de compañero de fusión preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, contribuyen a una producción estable a un nivel elevado de anticuerpo por las células seleccionadas productoras de los anticuerpos, y son sensibles a un medio selectivo que se selecciona contra las células parentales no fusionadas. Entre las líneas de células de mieloma preferidas están las líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California

USA, y las células SP-2 y derivadas, por ejemplo, células X63-Ag8-653, disponibles en la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Estados Unidos. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); y Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

[0133] Se analiza el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

[0134] La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[0135] Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal, por ejemplo, mediante inyección i.p. de las células en los ratones.

[0136] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales, tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, utilizando proteína A o proteína G-Sefarosa) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

[0137] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células *E. Coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de ningún otro modo producen proteína anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo se incluyen Skerra et al., *Curr. Opinión in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol Revs.*, 130:151-188 (1992).

[0138] En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monoclonales se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos generados utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (rango de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks et al., *Biol. Technology*, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas convencionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

[0139] El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para producir polipéptidos anticuerpo quiméricos o de fusión, por ejemplo, mediante la sustitución de las secuencias de los dominios constantes de cadena pesada y ligera (C_H y C_L) humanos por las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o mediante la fusión de la secuencia codificante de inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias de polipéptidos que no son inmunoglobulinas se pueden sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo divalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

[0140] Los anticuerpos anti-TAT de la presente invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las 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 dador), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón

("framework") de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o el armazón importados. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado optimamente también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente 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)].

[0141] Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que habitualmente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo 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 la sustitución de secuencias de CDRs o CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0142] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo anti-ratón de humano) cuando el anticuerpo pretende utilizarse para uso terapéutico humano. Según el método denominado "mejor-ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. Se identifica el dominio V humano de la secuencia humana que está más próxima a la del roedor y se acepta la región de armazón (FR) humana en el mismo para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método utiliza una región de armazón particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región de armazón se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

[0143] Es también importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos que muestran y visualizan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de secuencias receptoras e importadas, de manera que se consigue la característica del anticuerpo deseado, tal como una mayor afinidad para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

[0144] Se contemplan varias formas de un anticuerpo anti-TAT humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como Fab, que está conjugado opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

[0145] Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de inmunoglobulina endógena en la producción. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión (JH) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación con antígenos. Ver, por ejemplo Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2551-255 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362, 255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); y las Patentes de Estados Unidos 5.545.806, 5.569.825 y 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.547.807; y WO 97/17852.

[0146] Alternativamente, la tecnología de expresión de fagos (McCafferty et al., *Nature* 348, 552-553 [1990]) se puede utilizar para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos in vitro, a partir de repertorios de

genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en el marco en un gen de proteína de recubrimiento principal o secundario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. De este modo, el fago mimetiza algunas de las propiedades de la célula B. La expresión en fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión ver, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la expresión en fagos. Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) aislaron un conjunto diverso de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para un conjunto diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991), o Griffith et al., *EMBO J.* 12, 725-734 (1993). Véase también las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.565.332 y 5.573.905.

[0147] Tal como se ha descrito anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos por células B activadas *in vivo* (véase las Patentes de Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

4. Fragmentos de anticuerpos

[0148] En ciertas circunstancias, existen ventajas al utilizar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una depuración rápida y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos.

[0149] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir actualmente directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv se pueden todos expresar en y secretarse de *E. Coli*, permitiendo así la producción simple de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las bibliotecas de anticuerpos en fagos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y pueden acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con una mayor vida media *in vivo* que comprenden residuos de epítipo de unión a receptor salvaje se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el técnico de la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase WO 93/16185; Patente de Estados Unidos No. 5.571.894; y Patente de Estados Unidos No. 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos carentes de regiones constantes; de este modo, son adecuadas para una unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión con sFv se pueden construir para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un sFv. Véase, *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5. Anticuerpos biespecíficos

[0150] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión con por lo menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes de una proteína TAT tal como se describe aquí. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a TAT con un sitio de unión para otra proteína. Alternativamente, un brazo anti-TAT puede combinarse con un brazo que se une a una molécula inductora en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD3) o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) con el fin de centrar y localizar los mecanismos de defensa celulares en la célula que expresa TAT. Estos anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan TAT. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a TAT y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

[0151] WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRIII y la Patente de Estados Unidos 5.837.234 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRI. En WO98/02463 se muestra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fcα. La Patente de Estados Unidos No. 5.821.337 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

[0152] Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción

habitual de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda y los rendimientos de producto son bajos. En WO 93/08829 y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) se describen procesos similares.

[0153] Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (C_H1) contenga el sitio necesario para la unión a cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un único vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen un efecto significativo en el rendimiento de la combinación de cadenas deseadas.

[0154] En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera sencilla de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

[0155] Según otra estrategia descrita en la Patente de Estados Unidos No. 5.731.168, se puede diseñar la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivos de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio C_H3. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

[0156] Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980 junto con un grupo de técnicas de reticulación.

[0157] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se descomponen proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0158] El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. Coli.*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab')₂ completamente humanizada. Cada fragmento de Fab' se secretó por separado de *E. Coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica

de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

[0159] Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

[0160] Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

6. Anticuerpos heteroconjugados

[0161] Los anticuerpos heteroconjugados también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados Unidos No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen el iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980.

7. Anticuerpos multivalentes

[0162] Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido de la presente invención comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende por lo menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), donde la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido, y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente invención comprende preferiblemente además por lo menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente invención puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, además, comprenden un dominio CL.

8. Diseño de la función efectora

[0163] Se puede desear modificar el anticuerpo de la presente invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de aumentar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, el residuo o residuos de cisteínas se pueden introducir en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede mejorar la capacidad de internalización y/o incrementar la citólisis mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron et al., *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con una actividad anti-tumoral aumentada

también se pueden preparar utilizando entrecruzadores heterobifuncionales tal y como se describe en Wolf et al. *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo para que tenga regiones Fc duales y, de esta manera, pueda aumentar la lisis por complemento y las capacidades de ADCC. Véase, Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989). Para aumentar la vida media en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor salvaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 5,739,277, por ejemplo. Tal como se utiliza aquí, el término "epítipo de unión al receptor salvaje" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable del incremento de la vida media en suero *in vivo* de la molécula IgG.

9. Inmunoconjugados

[0164] La presente invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

[0165] Anteriormente se han descrito agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunoconjugados. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Existe un conjunto de radionucleidos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos son ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzóil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzóil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitella et al., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026.

[0166] También se contemplan en la presente invención conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tiene actividad de toxina.

Maitansina y maitansinoides

[0167] En una realización preferida, se conjuga un anticuerpo anti-TAT (longitud completa o fragmentos) a una o más moléculas maitansinoides.

[0168] Los maitansinoides son inhibidores mitotóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto *Maytenus serrata* del África del este (Patente de Estados Unidos No. 3,896,111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos No. (4,151,042). El maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; y 4,371,533, las memorias de las cuales se incorporan expresamente aquí por referencia.

Conjugados maitansinoide-anticuerpo

[0169] En un intento por mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han conjugado a anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,208,020, 5,416,064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1, las memorias de las cuales se incorporan expresamente aquí por referencia, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado como DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorectal humano. Se observó que el conjugado era altamente citotóxico hacia las células del cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumores *in vivo*. Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que se conjugó un maitansinoide a través de un enlace disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/*neu*. La citotoxicidad del conjugado Ta.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea de células de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3 x 10⁵

antígenos de la superficie de HER-2 por célula. El fármaco conjugado consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que se podía incrementar mediante el incremento del número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

5 Conjugados (inmunoconjugados) de anticuerpo anti-polipéptido TAT-maitansinoide

[0170] Los conjugados de anticuerpo anti-TAT-maitansinoide se preparan mediante la unión química de un anticuerpo anti-TAT a una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo han mostrado una eficacia en el aumento de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaba que incluso una molécula de toxina/anticuerpo aumentara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 y en las otras publicaciones de patente y no patente referidas anteriormente aquí. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol.

[0171] Existen muchos grupos enlazadores conocidos en la técnica para fabricar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 o Patente EP 0 425 235 B1, Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) y la solicitud de patente de Estados Unidos No. 10/960,602, solicitada el 8 de octubre de 2004, las memorias de las cuales se incorporan expresamente aquí por referencia. Los conjugados que comprenden anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC se pueden preparar tal como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 10/960,602 solicitada el 8 de octubre de 2004. Los grupos enlazadores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa o grupos lábiles a esterasa, tal como se describe en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferidos los grupos disulfuro y tioéter. En la presente invención se describen y ejemplifican grupos de unión adicionales.

[0172] Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden fabricar utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como, dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como, bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723-737 [1978]), y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

[0173] El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace éster puede estar formado por la reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede tener lugar en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Auristatinas y dolastatinas

[0174] En algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado a una dolastatina o análogo o derivado peptídico de dolastatina, por ejemplo, las auristatinas (Patentes de Estados Unidos N° 5.635.483; 5.780.588). Se ha observado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis del GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (patente de Estados Unidos N° 5.663.149) y actividad antifúngica (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El grupo farmacológico de dolastatina o auristatina puede estar unido al anticuerpo a través del extremo N (amino) terminal o del extremo C (carboxilo) terminal del grupo farmacológico peptídico (documento WO 02/088172).

[0175] Entre los ejemplos de realizaciones con auristatina se incluyen grupos farmacológicos DE y DF de monometilauristatina unidos al extremo N-terminal (es decir, MMAE y MMAF), descritos en "Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volumen 45, Número de Resumen 623, presentado el 28 de marzo de 2004, la memoria de la cual se incorpora expresamente por referencia en su totalidad.

[0176] Habitualmente, pueden prepararse grupos farmacológicos a base de péptidos mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pág 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de

péptidos. Los grupos farmacológicos de auristatina/dolastatina pueden prepararse según los procedimientos de: documentos US 5.635.483 y US 5.780.588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725 y Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863; y Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784.

5 Caliqueamicina

[0177] Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo anti-TAT conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN de doble cadena a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véase las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; y 5,877,296 (todas de la American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG, y θ_1^1 (Hinman et al, CancerRes 53: 3336-3342 (1993); Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral al que el anticuerpo se puede conjugar es QFA, un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos aumenta ampliamente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

[0178] Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar a los anticuerpos anti-TAT de la presente invención incluyen BCNU, estreptoizocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,053,394, 5,770,710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5,877,296).

[0179] Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

[0180] La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desorribonucleasa; ADNasa).

[0181] Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Existe un conjunto de isótopos radioactivos disponibles para la producción de anticuerpos anti-TAT radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el conjugado para el diagnóstico, puede comprender un átomo radioactivo para estudios centellográficos, por ejemplo Tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de spin para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123, de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0182] Los radiomarcadores u otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado de varias maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante la síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como, Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} se pueden unir mediante un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 se puede unir mediante un residuo de lisina. El método de IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57) se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

[0183] Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden fabricar utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador separable" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil en ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 [1992]; Patente de Estados Unidos No. 5,208,020).

[0184] Los compuestos de la presente invención contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con

los reactivos reticulantes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona) benzoato) que está disponible comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

5 **[0185]** Alternativamente, se puede fabricar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-TAT y agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado ya sea adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

10 **[0186]** En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en el pre-reconocimiento de tumores donde se administra el conjugado anticuerpo-receptor al paciente, seguido de la extracción del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente depurador y, a continuación, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleido).

15 10. Inmunoliposomas

[0187] Los anticuerpos anti-TAT descritos en la presente invención también se pueden formular como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivo que es útil para la liberación de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma están dispuestos habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Pat. de Estados Unidos Nos. 4.485.045 y 4.544.545; y WO97/38731 publicada el 23 de octubre de 1997. Liposomas con mayor tiempo de circulación se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.013.556.

25 **[0188]** Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente solicitud se pueden conjugar con los liposomas tal como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. En el liposoma está contenido opcionalmente un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989).

B. Oligopéptidos de unión a TAT

[0189] Los oligopéptidos de unión a TAT son oligopéptidos que se unen, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAT tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a TAT se pueden sintetizar químicamente utilizando la metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a TAT tienen habitualmente por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAT tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a TAT se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; Publicación PCT Nos. WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 178-182 (1985); Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102: 259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140: 611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin, Biotechnol., 2: 668).

[0190] En este aspecto, la expresión en bacteriófagos (fagos) es una técnica bien conocida que permite cribar bibliotecas grandes de oligopéptidos para identificar el miembro o miembros de estas bibliotecas que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana. La expresión en fago es una técnica por la cual se expresan variantes de polipéptidos como proteínas de fusión a la proteína de recubrimiento en la superficie de partículas de bacteriófagos (Scott, J.K. and Smith, G. P. (1990) Science, 249: 386). La utilidad de la expresión en fagos radica en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes de proteínas seleccionadas al azar (o ADNcs clonados al azar) se pueden separar rápida y eficazmente en las secuencias que se unen a una molécula diana con gran afinidad. La

expresión de bibliotecas de péptidos (Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378) o proteínas (Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363) en fagos se ha utilizado para cribar millones de polipéptidos u oligopéptidos en aquellos con propiedades de unión específicas (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2: 668). La separación de la bibliotecas en fagos de mutantes aleatorios requiere una estrategia para construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para la purificación por afinidad utilizando el receptor diana, y un medio de evaluación de los resultados de enriquecimientos de unión. Patentes de Estados Unidos nos. 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, y 5,663,143.

[0191] Aunque la mayoría de métodos de expresión en fago han utilizado sistemas de expresión en fago filamentoso, también son conocidos los sistemas de expresión en fago lamboide (WO 95/34683; U.S. 5,627,024), sistema de expresión en fago T4 (Ren et al., Gene, 215: 439 (1998); Zhu et al. Cancer Research, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang et al. Infection and Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren et al. Gene, 195(2): 303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5: 1833 (1996); Efimov et al., Virus Genes, 10: 173 (1995)) y sistemas de expresión en fago T7 (Smith y Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); U.S. 5,766,905).

[0192] Actualmente se han desarrollado muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de expresión en fagos. Estas mejoras aumentan la capacidad de los sistemas de expresión para cribar bibliotecas de péptidos para unirse a moléculas diana seleccionadas y para expresar proteínas funcionales con el potencial de cribar estas proteínas por las propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatoria para las reacciones de expresión en fagos (WO 98/14277) y se han utilizado bibliotecas de expresión en fagos para analizar y controlar interacciones bimoleculares (WO 98/20169; WO 98/20159) y propiedades de péptidos helicoidales obligados (WO 98/20036). WO 97/35196 describe un método para aislar un ligando de afinidad en el que se pone en contacto una biblioteca de expresión en fagos con una solución en la que el ligando se unirá a una molécula diana y una segunda solución en la que el ligando de afinidad no se unirá a la molécula diana, para aislar selectivamente los ligandos de unión. WO 97/46251 describe un método para la bioadsorción de una biblioteca de expresión en fagos aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad y a continuación el aislamiento del fago de unión, seguido de un proceso de microadsorción utilizando pocillos de microplacas para aislar el fago de unión con afinidad elevada. También se ha descrito el uso de proteína A de *Staphylococcus aureus* como etiqueta de afinidad (Li et al. (1998) Mol Biotech., 9: 187). WO 97/47314 describe el uso de bibliotecas de sustracción de sustrato para distinguir las especificidades de enzima utilizando una biblioteca combinatoria que puede ser una biblioteca de expresión en fagos. En WO 97/094446 se describe un método para seleccionar enzimas adecuadas para su uso en detergentes utilizando la expresión en fagos. Métodos adicionales de selección de proteínas de unión específica se describen en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,498,538, 5,432,018, y WO 98/15833.

[0193] Los métodos de generación de bibliotecas de péptidos y cribado de estas bibliotecas también se describen en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,723,286, 5,432,018, 5,580,717, 5,427,908, 5,498,530, 5,770,434, 5,734,018, 5,698,426, 5,763,192, y 5,723,323.

C. Moléculas orgánicas de unión a TAT

[0194] Las moléculas orgánicas de unión a TAT son moléculas orgánicas diferentes de oligopéptidos o anticuerpos tal como se definen aquí, que se unen, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAT tal como se describe aquí. Las moléculas orgánicas de unión a TAT se pueden identificar y sintetizar químicamente utilizando metodología conocida (véase, por ejemplo, Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a TAT tienen habitualmente menos de aproximadamente 2000 daltons de tamaño, alternativamente menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 ó 200 daltons de tamaño, donde dichas moléculas orgánicas que son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido tal como se describe aquí, se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de moléculas orgánicas en moléculas que son capaces de unirse a un polipéptido diana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a TAT pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidrazinas N-sustituidas, hidrazidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, ureas, carbamatos, carbonatos, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, haluros de arilo, sulfonatos de arilo, haluros de alquilo, sulfonatos de alquilo, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alquinos, dioles, amino alcoholes, oxazolidinas, oxazolininas, tiazolidinas, tiazolininas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonilo, compuestos diazo, cloruros de ácido o similares.

D. Cribado de anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos de unión a TAT y moléculas orgánicas de unión a TAT con las propiedades deseadas.

[0195] Las técnicas para generar anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas que se unen a polipéptidos TAT se han descrito anteriormente. Se pueden seleccionar además anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas con ciertas características biológicas, según se desee.

[0196] Los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido u otra molécula orgánica de la

invención se pueden valorar mediante los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando células que expresan un polipéptido TAT endógenamente o tras la transfección con el gen de TAT. Por ejemplo, las líneas de células tumorales y las células transfectadas con TAT apropiadas se pueden tratar con un anticuerpo monoclonal anti-TAT, oligopéptido u otra molécula orgánica de la invención a varias concentraciones durante unos días (por ejemplo, 2-7 días) y se pueden teñir con violeta cristal o MTT o analizarse mediante algún otro ensayo colorimétrico. Otro método de medición de la proliferación sería mediante la comparación de la captación de ³H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT de la invención. Después del tratamiento, las células se recogen y se cuantifica la cantidad de radioactividad incorporada en el ADN en un contador de centelleo. Los controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibir el crecimiento de esa línea celular. La inhibición del crecimiento de las células tumorales *in vivo* se puede determinar de varias maneras conocidas en la técnica. Preferiblemente, la célula tumoral es la que sobreexpresa un polipéptido TAT. Preferiblemente, el anticuerpo anti-TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT inhibirán la proliferación celular de una célula tumoral que expresa TAT *in vitro* o *in vivo* en aproximadamente 25-100% en comparación con la célula tumoral no tratada, más preferiblemente, en aproximadamente 30-100%, e incluso más preferiblemente en aproximadamente 50-100% ó 70-100%, en una realización, a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-TAT de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da lugar a la reducción del tamaño tumoral o la reducción de la proliferación del tumor dentro de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente dentro de aproximadamente 5 a 30 días.

[0197] Para seleccionar un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT que inducen la muerte celular, se pueden evaluar la pérdida de integridad de la membrana indicada mediante, por ejemplo, la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano o 7AAD en relación al control. Se puede realizar un ensayo de captación de PI en ausencia de complemento y células efectoras inmunes. Las células tumorales que expresan el polipéptido TAT se incuban con medio solo o medio que contiene el anticuerpo anti-TAT (por ejemplo, a aproximadamente 10 µg/ml), un oligopéptido de unión a TAT o una molécula orgánica de unión a TAT apropiados. Las células se incuban durante un periodo de 3 días. Tras cada tratamiento, las células se lavan y se fraccionan en tubos 12x 75 de tapón colador de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la extracción de grupos de células. A continuación, los tubos reciben PI (10 µg/ml). Las muestras se pueden analizar utilizando un citómetro de flujo FACSCAN® y el software FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos de unión a TAT o moléculas de unión a TAT que inducen estadísticamente niveles significativos de la muerte celular determinada mediante la captación de PI se pueden seleccionar como anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos de unión a TAT o moléculas orgánicas de unión a TAT inductoras de la muerte celular.

[0198] Para cribar anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas que se unen a un epítipo en un polipéptido TAT unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Este ensayo se puede utilizar para determinar si un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica de análisis se unen al mismo sitio o epítipo que un anticuerpo anti-TAT conocido. Alternativa o adicionalmente, la localización del epítipo se realiza mediante métodos conocidos en el sector. Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo se puede mutagenizar mediante, por ejemplo, rastreo de alanina, para identificar residuos de contacto. El anticuerpo mutante se analiza inicialmente por su unión con anticuerpo policlonal para asegurar el pliegue correcto. En un método diferente, se pueden utilizar péptidos correspondientes a diferentes regiones de un polipéptido TAT en ensayos de competición con los anticuerpos de análisis o con un anticuerpo de análisis y un anticuerpo con un epítipo caracterizado o conocido.

E. Terapia de profármaco mediada por enzimas dependiente de anticuerpo (ADEPT)

[0199] Los anticuerpos de la presente invención también se pueden utilizar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase WO 81/01145) en un fármaco anticanceroso activo. Véase, por ejemplo, WO 88/07378 y la Patente de Estados Unidos No. 4.975.278.

[0200] El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de manera que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

[0201] Entre las enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención se incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como serratina proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que dividen los carbohidratos, tales como β-galactosidasa y

neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilin amidasa, tales como penicilin V amidasa o penicilin G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas" se pueden utilizar para convertir los profármacos de la solicitud en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey *Nature* 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar tal y como se ha descrito en la presente invención para la liberación de la abzima a una población de células tumorales.

[0202] Las enzimas de la presente invención se pueden unir covalentemente a los anticuerpos anti-TAT mediante técnicas bien conocidas en el sector, tales como la utilización de los reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales descritos anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención unida a por lo menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención se pueden construir utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en el sector (véase, por ejemplo, Neuberger et al., *Nature* 312: 604-608 (1984)).

F. Polipéptidos TAT de longitud completa

[0203] La presente invención se refiere a secuencias de nucleótidos recientemente identificadas y aisladas que codifican polipéptidos a los que se hace referencia en la presente solicitud como polipéptidos TAT. En particular, se han identificado y aislado los ADNc (parciales y de longitud completa) que codifican varios polipéptidos TAT, tal y como se describe con mayor detalle en los posteriores ejemplos.

[0204] Tal y como se describe en los Ejemplos posteriores, se han depositado varios clones de ADNc con el ATCC. Las secuencias de nucleótidos reales de los clones se pueden determinar fácilmente por un experto en la materia mediante la secuenciación del clon depositado utilizando procedimientos rutinarios en la técnica. Las secuencias de aminoácidos previstas se pueden determinar a partir de las secuencias de nucleótidos utilizando la técnica rutinaria. Para los polipéptidos TAT y los ácidos nucleicos codificantes descritos en la presente invención, en algunos casos, los solicitantes han identificado lo que se cree que son los mejores marcos de lectura identificables con la información de la secuencia disponible en el momento.

G. Variantes de anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT

[0205] Además de los anticuerpos anti-TAT y los polipéptidos TAT de secuencia nativa y de longitud completa descritos en la presente invención, se contempla que se pueden preparar variantes de anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT. Las variantes de anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante y/o mediante la síntesis del polipéptido o anticuerpo deseados. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclamiento a la membrana.

[0206] Las variaciones en los anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT descritos en la presente invención, se pueden realizar, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una eliminación o una inserción de uno o más codones que codifican el anticuerpo o el polipéptido que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT. Al determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa la actividad deseada, se puede encontrar una guía mediante la comparación de la secuencia del anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones con elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tienen una estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones conservativas de aminoácidos. Las inserciones o eliminaciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar realizando sistemáticamente inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y analizando en las variantes resultantes la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

[0207] En la presente invención se proporcionan fragmentos de anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con un anticuerpo o proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT.

[0208] Los fragmentos del anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT se pueden preparar mediante cualquiera de un conjunto de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un

- 5 enfoque alternativo implica la generación de fragmentos de anticuerpo o polipéptido mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida por dividir proteínas en los sitios definidos por residuos de aminoácidos concretos o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y el aislamiento del fragmento deseado. Otra técnica adecuada implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica un fragmento de anticuerpo o polipéptido deseado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se utilizan en los cebadores de los extremos 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT nativos descritos aquí.
- 10 **[0209]** En realizaciones particulares, las sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla 6 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen cambios más sustanciales denominados "ejemplos de sustituciones" en la Tabla 6 o, tal como se describe posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y se criban los productos.

Tabla 6

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Substituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (U)	glu; asn	glu
Cys(C)	ser; ala	ser
Gln(Q)	asn; glu	asn
Glu(E)	Asp; gln	asp
Gly(G)	pro; ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu(L)	Norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	Trp; leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro(P)	Ala	ala
Ser(S)	Thr	thr
Thr(T)	Val; ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

- 15 **[0210]** Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT se realizan mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener: (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hélice o lámina, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral:
- 20 (1) hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílico neutro: cys, ser, thr; asn; gln

- (3) ácido: asp, glu;
- (4) básico: his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

5 **[0211]** Las sustituciones no conservativas comprenderán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también se pueden introducir en sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados)

10 **[0212]** Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), el rastreo de alanina, y mutagénesis por PCR. Para fabricar el ADN variante del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se puede llevar a cabo sobre el ADN clonado una mutagénesis dirigida de sitio [Carter et al., *Nucl. Acids. Res.*, 13: 4331 (1986); Zoller et al., *Nucl. Acids. Res.*, 10: 6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells et al., *Gene*, 34 315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

15 **[0213]** El análisis de aminoácidos por rastreo también se puede realizar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferidos están los aminoácidos relativamente pequeños y neutros. Entre dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácido de rastreo preferido de este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)]. La alanina es también habitualmente preferida ya que es el aminoácido más habitual. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman and Co., N.Y.), Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

25 **[0214]** También se puede sustituir, generalmente por serina, cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. En cambio, se pueden añadir el enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

30 **[0215]** Un tipo particularmente preferido de variante por sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes por sustitución implica la maduración por afinidad utilizando la expresión en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de esta manera se expresan de manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado en cada partícula. A continuación, las variantes expresadas en el fago se criban por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se describe en la presente invención. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede aplicar la mutagénesis por rastreo de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura del cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el polipéptido TAT humano. Dichos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en la presente invención. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe en la presente invención y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para un desarrollo posterior.

50 **[0216]** Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TAT se preparan mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes en las secuencias de aminoácidos naturales) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida de sitio), la mutagénesis de PCR y la mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-TAT.

H. Modificaciones de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT

55 **[0217]** Se describen modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos marcados de un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT con una matriz o

superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-TAT, y viceversa. Entre los agentes entrecruzadores utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

[0218] Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)], acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

[0219] Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT incluido en el alcance de la presente invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del anticuerpo o polipéptido. Por "alteración del patrón de glicosilación nativo" para los objetivos de la presente invención se pretende indicar la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT de secuencia nativa (mediante la eliminación del sitio de glicosilación subyacente o mediante la eliminación de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, implicando un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos grupos de carbohidrato presentes.

[0220] La glicosilación de anticuerpos y otros polipéptidos es habitualmente por unión a N o unión a O. La unión a N se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripéptido en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La glicosilación por unión a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[0221] La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se puede realizar convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos, de manera que contiene una o más de las secuencias tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT original (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

[0222] Otros medios para aumentar el número de grupos carbohidrato en el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 259-306 (1981).

[0223] La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se puede realizar química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican los residuos de aminoácidos que actúan como dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación química son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, et. al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) y por Edge, et al. *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). La división enzimática de grupos carbohidrato en los polipéptidos se puede conseguir mediante la utilización de un conjunto de endo- y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura et al. *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

[0224] Otro tipo de modificación covalente de anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT comprende la unión del anticuerpo o polipéptido a uno del conjunto de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma establecida en las Patentes de Estados Unidos Nos: 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337. El anticuerpo o polipéptido pueden también encapsularse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato) respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Osol, A. ed. (1980).

[0225] El anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT también se pueden modificar de una manera que forme moléculas quiméricas que comprenden un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT fusionados a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo.

[0226] En un ejemplo, dicha molécula quimérica comprende una fusión del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo-etiqueta se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT. La presencia de dichas formas epítipo etiquetadas del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se pueden detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítipo etiqueta permite que el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo etiqueta. En la técnica se conocen varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta de gripe HA y su anticuerpo 12C45 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky et al., Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)]. Entre otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido Flag [Hopp et al., BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epítipo KT3 [Martin et al., Science, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítipo de α -tubulina [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y el péptido etiqueta de la proteína T7 del gen 10 [Lutz-Freyemuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)].

[0227] En un ejemplo alternativo, la molécula quimérica puede comprender una fusión del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también referida como "inmunoadhesina"), dicha fusión podría ser a la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT en lugar de por lo menos una región variable de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH₂ y CH₃, o la bisagra, regiones CH₁, CH₂ y CH₃ de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la Patente de Estados Unidos No. 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

I. Preparación de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT

[0228] La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT. Naturalmente, se prevé que se puedan utilizar procedimientos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar los anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, se pueden producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente por separado varias partes del anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT y combinarse utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT deseado.

1. Aislamiento del ADN que codifica un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT

[0229] El ADN que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm del anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT y lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o mediante métodos de síntesis conocidos (por ejemplo, síntesis de ácidos nucleicos automatizada).

[0230] Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT es utilizar la metodología de PCR [Sambrook et al., supra; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

[0231] Las técnicas que describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc son bien conocidas. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y suficientemente inequívoca que se minimizan los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado de manera que se puede detectar tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen la utilización de radiomarcadores como ATP marcado con ³²P, biotilación o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y la astringencia elevada, se proporcionan en Sambrook et al., supra.

[0232] Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicos, tales como el Banco de Genes u otras bases de datos privadas de secuencias. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácido o nucleótido) en las regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa se puede determinar utilizando procedimientos conocidos en la técnica y tal y como se describen en la presente invención.

[0233] El ácido nucleico que tiene la secuencia de codificación de la proteína se puede obtener mediante el cribado del ADNc seleccionado o las bibliotecas genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida descrita en la presente invención por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión con cebadores tal y como se describe en Sambrook et al., supra, para detectar precursores y procesando intermedios de ARNm que no se han transcrito de forma inversa en ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

[0234] Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente invención para la producción del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden seleccionar por un experto en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook et al., supra.

[0235] Los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar adecuadas a dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en Sambrook et al., supra, o la electroporación se utilizan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describe Shaw et al., Gene, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transfecciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo habitualmente según el procedimiento de Van Solingen et al., J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policondones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver Keown et al., Methods in enzymology, 185:527-537 (1990) y Manssur et al., Nature, 336. 348-352 (1988).

[0236] Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células procariotas, levadura, o eucariotas superiores. Entre las procariotas adecuadas se incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como *E. Coli*. Varias cepas de *E. Coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. Coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. Coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. Coli* W3110 (ATCC 27.325) y cepa de *E. Coli* K5772 (ATCC 53.635). Entre otras células huésped procariotas adecuadas se incluyen Enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. Coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. La Cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferible ya que es una cepa de huésped habitual para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para realizar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, con ejemplos de dichos huéspedes incluyendo la cepa de *E. Coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa de *E. Coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa de *E. Coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r*; la cepa de *E. Coli* W3110 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; la cepa de *E. Coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de eliminación *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. Coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrita en la Patente de Estados Unidos No. 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

[0237] El anticuerpo de longitud completa, fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión de anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glicosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de la célula tumoral. Los anticuerpos de longitud completa presentan una vida media mayor en la circulación. La producción en *E. Coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5,648,237

(Carter et. al.), la Patente de Estados Unidos 5,789,199 (Joly et al.), y la Patente de Estados Unidos 5,840,523 (Simmons et al.) que describen la región de iniciación de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y secreción, estas patentes incorporadas aquí por referencia. Después de la expresión, se aísla el anticuerpo de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar a través de, por ejemplo, una columna de proteína A o G, dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado en, por ejemplo, células CHO.

[0238] Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos No. 4.943.529; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Louvencourt et al. J. Bacteriol., 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135(1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna et al., J. Basic. Microbiol. 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991), y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. Niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotróficas son adecuadas en la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz del crecimiento en metanol seleccionada del género que consiste en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylophs, 269 (1982).

[0239] Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT glicosilados se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales, tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han modificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y las correspondientes células huéspedes de insecto permisivas de huéspedes, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una serie de cepas víricas para la transfección están públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden utilizar como el virus según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[0240] Sin embargo, el mayor interés ha estado en las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en un cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Entre los ejemplos de líneas celulares de huéspedes mamíferos útiles están la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0241] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT y se cultivan en un medio con nutrientes habituales modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

3. Selección e utilización de un vector replicable

[0242] El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen varios vectores disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector mediante una serie de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en el sector. Los componentes de los vectores incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas de unión estándar que son conocidas por un experto en la materia.

- [0243]** El polipéptido TAT se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduros. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de secuencias líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina II estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la secuencia líder de invertasa de levadura, la secuencia líder del factor alfa (incluyendo las secuencias líder del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, la última descrita en la Patente de Estados Unidos No. 5.010.182), o la secuencia líder de fosfatasa ácida, la secuencia líder de *C. Albicans* glucoamilasa (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como secuencias líderes secretoras virales.
- [0244]** Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite la replicación del vector en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son conocidas para un conjunto de bacterias, levadura, y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas, el origen del plásmido 2μ es adecuado para la levadura, y orígenes virales varios (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos.
- [0245]** Los vectores de clonación y expresión contendrán habitualmente un gen de selección, también denominado como marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.
- [0246]** Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo salvaje es la línea de células CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal y como se describe por Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 [Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].
- [0247]** Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT para dirigir la síntesis de ARNm. Son conocidos promotores reconocidos por un conjunto de células huésped potenciales. Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas se incluyen los sistemas de promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT.
- [0248]** Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su utilización con huéspedes de levadura se incluyen promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otros enzimas glucolíticos [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], tal como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucoisomerasa y glucoquinasa.
- [0249]** Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen en detalle en EP 73.657.
- [0250]** La transcripción del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT a partir de vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del polioma, virus de la viruela aviar (Patente UK 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40), a partir de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos

promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

[0251] Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT por eucariotas superiores mediante la inserción de una secuencia de potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Actualmente se conocen muchas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en la cara tardía del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar ("splice") en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante del anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' con respecto al promotor.

[0252] Los vectores de expresión utilizados en células huéspedes eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente desde las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN's o ADNcs eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT.

[0253] En Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058 se describen adicionalmente otros procedimientos, vectores, y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis del anticuerpo anti-TAT o el polipéptido TAT en cultivos de células de vertebrados recombinantes.

4. Cultivo de células huésped

[0254] Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT de la presente invención se pueden cultivar en un conjunto de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., *Meth. Enz.*, 58: 44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Patente de Estados Unidos Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o la Patente de Estados Unidos Re. 30,985 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMICINATM), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a concentraciones finales en el rango micromolar) y la glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en las concentraciones apropiadas que serían conocidas por un experto en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y será evidente para el experto en la materia.

5. Detección de la amplificación/expresión de los genes

[0255] La amplificación y/o expresión de los genes se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer dobles cadenas específicas, incluyendo dobles cadenas de ADN, dobles cadenas de ARN, dobles cadenas híbridas de ADN-ARN o dobles cadenas de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando la doble cadena está unida a una superficie, de manera que tras la formación de la doble cadena en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpos unidos a la doble cadena.

[0256] La expresión génica, alternativamente, se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y el ensayo de cultivo de células o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido TAT de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a ADN de TAT que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

6. Purificación de anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT

[0257] Las formas de anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se pueden recuperar del medio de cultivo o de los

lisatos de células huésped. Si está unido a membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton X-100) o mediante división enzimática. Las células utilizadas en la expresión del anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT se pueden romper mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, destrucción mecánica, o agentes para lisar células.

[0258] Se puede desear purificar el anticuerpo anti-TAT y el polipéptido TAT a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; "cromatofocusing"; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A seferosa para eliminar contaminantes, tales como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas con epítipo del anticuerpo anti-TAT y el polipéptido TAT. Se pueden utilizar varios métodos de purificación de proteínas y dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT concreto producido.

[0259] Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o se secreta directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, se elimina el residuo celular particulado, ya sean células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. Coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. La debris celular se puede eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en general se concentran en primer lugar utilizando un filtrador de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes extraños.

[0260] La composición de anticuerpos preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., *EMBO J.* 5: 1565-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más elevadas y tiempos de procesamiento más cortos que los conseguidos con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSETM, cromatografía en una resina de intercambio aniónica o catiónica (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatofocusing ("chromatofocusing"), SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

[0261] Tras la etapa o etapas de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes se puede someter a una cromatografía de interacción hidrofóbica de pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente se realiza a concentraciones bajas de sal (por ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

J. Formulaciones farmacéuticas

[0262] Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos de unión a TAT, moléculas orgánicas de unión a TAT y/o polipéptidos TAT utilizados según la presente invención se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla del anticuerpo, polipéptido, oligopéptido o molécula orgánica que tienen el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; tónicos, tales

como terhalosa y cloruro sódico; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensoactivos, tales como polisorbato; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo comprende preferiblemente el anticuerpo a una concentración entre 5 y 200 mg/ml, preferiblemente entre 10 y 100 mg/ml.

[0263] La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad concreta a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, además del anticuerpo anti-TAT, oligopéptido de unión a TAT, o molécula orgánica de unión a TAT, puede ser deseable incluir en la formulación un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-TAT que se une a un epítipo diferente en el polipéptido TAT, o un anticuerpo para alguna otra diana, tal como un factor de crecimiento que afecta al crecimiento del cáncer concreto. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente anti-hormonal, y/o un cardioprotector. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

[0264] Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización entre fases, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetakrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0265] Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metakrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

[0266] Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

K. Diagnostico y tratamiento con anticuerpos Anti-TAT, oligopéptidos de unión a TAT, y moléculas orgánicas de unión a TAT

[0267] Para determinar la expresión de TAT en el cáncer, están disponibles varios ensayos de diagnóstico. En una realización, la sobreexpresión del polipéptido TAT puede analizarse mediante inmunohistoquímica (IHC). Las secciones de tejido bañadas en parafina de una biopsia de tumor pueden someterse al ensayo IHC y acordarse unos criterios de intensidad de tinción de la proteína TAT tal y como se indica a continuación:

Valoración 0 – no se observa tinción o tinción de membrana en menos del 10% de células tumorales.

Valoración 1+ - se detecta una tinción de membrana débil/apenas perceptible en más del 10% de las células tumorales. Las células sólo se tiñen en parte de sus membranas.

Valoración 2+ - se observa una tinción de membrana completa de débil a moderada en más del 10% de las células tumorales.

Valoración 3+ - se observa una tinción de membrana completa de moderada a fuerte en más del 10% de las células tumorales.

[0268] Los tumores con una valoración 0 ó 1+ para la expresión de polipéptido TAT pueden caracterizarse como que no sobreexpresan TAT, mientras que los tumores con resultados 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que sobreexpresan TAT.

[0269] Alternativamente, o adicionalmente, pueden realizarse ensayos FISH tal como el INFORM® (vendido por Ventana, Arizona) o PATHVISION® (Vysis, Illinois) en tejido tumoral fijado a formalina y bañado en parafina para determinar el grado (si lo hay) de sobreexpresión de TAT en el tumor.

[0270] Puede evaluarse la amplificación o la sobreexpresión de TAT utilizando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo, mediante la administración de una molécula (como un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica) que se une a la molécula a detectar y que está marcado con una etiqueta detectable (por ejemplo, un isótopo radioactivo o un marcador fluorescente) y el rastreo externo del paciente para la localización del marcador.

[0271] Tal y como se describe anteriormente, los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos y moléculas orgánicas tienen varias aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos y moléculas orgánicas pueden ser útiles para el diagnóstico y determinación del estadio de cánceres que expresan los polipéptidos TAT (por ejemplo, en radioimagen). Los anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas también son útiles para la purificación o la inmunoprecipitación de polipéptido TAT a partir de células, para la detección y la cuantificación de polipéptido TAT *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western, para matar y eliminar células que expresan TAT de una población de células mezcladas como una etapa en la purificación de las otras células.

[0272] Actualmente, dependiendo del estadio del cáncer, el tratamiento del cáncer implica una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para eliminar el tejido canceroso, radioterapia, y quimioterapia. La terapia con anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica puede ser deseable especialmente en pacientes ancianos que no toleran bien la toxicidad y los efectos secundarios de la quimioterapia y en enfermedad metastásica donde la radioterapia tiene una utilidad limitada. Los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos, y moléculas orgánicas que reconocen tumores son útiles para aliviar los cánceres que expresan TAT tras su diagnóstico inicial de la enfermedad o durante la recaída. Para aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica pueden utilizarse solos, o en terapia de combinación con, por ejemplo, hormonas, antiangiogénos, o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia, y/o radioterapia. El tratamiento con anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica puede administrarse conjuntamente con otras formas de terapia convencional, ya sea consecutivamente con, terapia pre- o post-convencional. Se utilizan fármacos quimioterapéuticos, tales como TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona, en el tratamiento del cáncer, en concreto, en pacientes con riesgo. En los métodos actuales de la invención para tratar o aliviar el cáncer, a los pacientes de cáncer se les puede administrar anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica conjuntamente con el tratamiento con uno o más de los agentes quimioterapéuticos anteriores. En concreto, se contempla la terapia de combinación con paclitaxel y derivados modificados (ver, por ejemplo, EP0600517). Se administrará el anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica con una dosis terapéuticamente efectiva del agente quimioterapéutico. En otra realización, se administra el anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica conjuntamente con quimioterapia para potenciar la actividad y la eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. La Physicians' Desk Reference (PDR) describe dosis de estos agentes que han sido utilizados en el tratamiento de varios cánceres. El régimen de dosificación y la dosis de estos fármacos quimioterapéuticos anteriormente mencionados que son efectivos terapéuticamente dependerán del cáncer concreto que se trata, la extensión de la enfermedad y otros factores familiares para los médicos expertos en la materia y pueden ser determinados por el médico.

[0273] En una realización particular, se administra al paciente un conjugado que comprende un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica conjugados con un agente citotóxico. Preferiblemente, el inmunoconjugado unido a la proteína TAT es internalizado por la célula, dando lugar a una eficacia terapéutica incrementada del inmunoconjugado en la citólisis de la célula cancerosa a la que se une. En una realización preferente, el agente citotóxico reconoce o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Anteriormente se han descrito ejemplos de dichos agentes citotóxicos y se incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

[0274] Se administran los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos, moléculas orgánicas o conjugados a toxina de los mismos a un paciente humano, según los procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, "como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo, oligopéptido, o molécula orgánica.

[0275] Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración del anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica. La administración combinada incluye la co-administración, utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferiblemente hay un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferiblemente, dicha terapia combinada da lugar a un efecto terapéutico sinérgico.

[0276] También puede ser deseable combinar la administración del anticuerpo o anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos, o moléculas orgánicas con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno tumoral asociado con el cáncer concreto.

[0277] En otro ejemplo, los métodos de tratamiento terapéuticos implican la administración combinada de un anticuerpo anti-TAT (o anticuerpos), oligopéptidos o moléculas orgánicas y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos). Entre los agentes quimioterapéuticos se incluyen fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalano, ciclofosfamida, hidroxurea e hidroxureataxanos (tales como, paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. La preparación y pautas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar según las instrucciones de los fabricantes o tal como se determina empíricamente por el técnico en la materia. La preparación y pautas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

[0278] El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se pueden combinar con un compuesto anti-hormonal, por ejemplo, un compuesto anti-estrógeno, tal como tamoxifeno; una anti-progesterona, tal como onapristona (véase, EP 616 812); o un anti-andrógeno, tal como flutamida, en dosis conocidas para dichas moléculas. Cuando el cáncer a tratar es un cáncer independiente de andrógeno, el paciente puede haber sido sometido previamente a terapia anti-andrógeno y, después de que el cáncer se convierta en independiente de andrógeno, se puede administrar al paciente el anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica (y opcionalmente otros agentes tal como se describen en la presente invención)

[0279] A veces, puede ser beneficioso coadministrar también un cardioprotector (para evitar o reducir la disfunción miocardiaca asociada con la terapia) o una o más citoquinas al paciente. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente se puede someter a una extracción quirúrgica de células cancerosas y/o terapia de radiación, antes, simultáneamente o posteriormente a la terapia con anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas. Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son aquellas utilizadas actualmente y pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica.

[0280] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis y el modo de administración serán elegidos por el médico según criterios conocidos. La dosis apropiada de anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal y como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se administran con objetivos de prevención o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica y el criterio del médico responsable. El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se administran de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Preferiblemente, el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se administra mediante infusión intravenosa o mediante inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg hasta 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, aproximadamente 0,1-15 mg/kg/dosis) de anticuerpo puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, mediante, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una pauta de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-TAT. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. Una dosis diaria habitual podría variar desde, aproximadamente, 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que tiene lugar la desaparición deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de esta terapia se puede monitorizar fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales y en base a criterios conocidos para el médico u otras personas expertas.

[0281] A parte de la administración de la proteína anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo mediante terapia génica. Dicha administración de ácido nucleico que codifica el anticuerpo esta comprendida por la expresión "administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo". Véase, por ejemplo, WO96/07321 publicada el 14 de marzo de 1996 que se refiere al uso de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

[0282] Existen dos estrategias principales para introducir el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para la liberación *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, normalmente en el punto donde se necesita el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, se extraen las células del paciente, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y se administran las células modificadas al paciente, ya sea directamente o, por ejemplo, encapsuladas en membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.892.538 y 5.283.187). Existen una serie de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector utilizado normalmente para la liberación *ex vivo* del gen es un vector retroviral.

[0283] Entre las técnicas actuales de transferencia de ácido nucleico *in vivo* actuales preferidas se incluyen la transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus del herpes simplex I, o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol). Para una revisión de los protocolos de marcaje génico y terapia génica actualmente conocidos, véase Anderson et al., Science 256: 808-813 (1992). Véase también WO 93/25673 y las referencias citadas en la misma.

[0284] Los anticuerpos anti-TAT de la invención pueden estar en las diferentes formas comprendidas por la definición de "anticuerpo" de la presente invención. De este modo, los anticuerpos incluyen anticuerpos de longitud completa o intactos, fragmentos de anticuerpos, variantes de anticuerpo o aminoácidos de secuencia nativa, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, inmunoconjugados y fragmentos funcionales de los mismos. En los anticuerpos de fusión, se fusiona una secuencia de anticuerpo a una secuencia de polipéptido heteróloga. Los anticuerpos se pueden modificar en la región Fc para proporcionar las funciones efectoras deseadas. Tal como se

describe en detalle en las secciones de la presente invención, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido en la superficie celular puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o mediante el reclutamiento de complemento en citotoxicidad dependiente de complemento, o algún otro mecanismo. Alternativamente, se pueden utilizar algunas otras regiones Fc cuando es deseable eliminar o reducir la función efectora para minimizar los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas.

[0285] En una realización, el anticuerpo compite por la unión o por unirse sustancialmente al mismo epítipo que los anticuerpos de la solicitud. También se contemplan los anticuerpos que tienen características biológicas de los presentes anticuerpos anti-TAT de la invención, específicamente incluyendo el reconocimiento de tumores *in vivo* y cualquier inhibición de proliferación celular o características citotóxicas.

Métodos para producir los anticuerpos anteriores se describen en detalle aquí.

[0286] Los presentes anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos, o moléculas orgánicas son útiles para tratar un cáncer que expresa TAT o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Dicho cáncer incluye cáncer de próstata, cáncer del tracto urinario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal y cáncer de ovario, más específicamente, adenocarcinoma de próstata, carcinomas de células renales, adenocarcinomas colorrectales, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas de células escamosas de pulmón, y mesotelioma pleural. Los cánceres comprenden cánceres metastáticos de cualquiera de los anteriores. El anticuerpo, oligopéptido, o molécula orgánica son capaces de unirse a por lo menos una parte de las células cancerosas que expresan el polipéptido TAT en el mamífero. Preferiblemente, el anticuerpo, oligopéptido, o molécula orgánica son eficaces para destruir o eliminar células tumorales que expresan TAT o para inhibir el crecimiento de dichas células tumorales, *in vitro* o *in vivo*, tras la unión al polipéptido TAT en la célula. Dicho anticuerpo incluye un anticuerpo anti-TAT desnudo (no conjugado a ningún agente). Los anticuerpos desnudos que tienen propiedades citotóxicas o de inhibición del crecimiento celular se pueden aprovechar adicionalmente con un agente citotóxico para hacerlos incluso más potentes en la destrucción de células tumorales. Las propiedades citotóxicas se pueden conferir a un anticuerpo anti-TAT mediante, por ejemplo, la conjugación del anticuerpo con un agente citotóxico, para formar un inmunconjugado tal como se describe aquí. El agente citotóxico o el agente inhibidor del crecimiento es preferiblemente una molécula pequeña. Son preferibles las toxinas tales como caliqueamicina o un maitansinoide y análogos o derivados de las mismas.

[0287] También se describe aquí una composición que comprende un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica descritas aquí y un portador. Para los objetivos del tratamiento del cáncer, las composiciones se pueden administrar al paciente con necesidad de dicho tratamiento, donde la composición puede comprender uno o más anticuerpos anti-TAT presentes como un inmunconjugado o como el anticuerpo desnudo. En un ejemplo adicional, las composiciones pueden comprender estos anticuerpos, oligopéptidos, o moléculas orgánicas en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como agentes citotóxicos o inhibidores del crecimiento, incluyendo agentes quimioterapéuticos. También se describen formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica y un portador. En un ejemplo, la formulación es una formulación terapéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

[0288] Otro aspecto son ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-TAT. Se comprenden ácidos nucleicos que codifican las cadenas H y L y especialmente los residuos de la región hipervariable, cadenas que codifican el anticuerpo de secuencia nativa, así como variantes, modificaciones y versiones humanizadas del anticuerpo.

[0289] También se describen aquí métodos útiles para tratar un cáncer que expresa el polipéptido TAT o que alivia uno o más síntomas del cáncer en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica al mamífero. Las composiciones terapéuticas de anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se pueden administrar a corto plazo (agudo) o crónico, o intermitente según indique el médico. También se describen métodos de inhibición del crecimiento y citólisis de una célula que expresa el polipéptido TAT.

[0290] También se describen kits y artículos de fabricación que comprenden por lo menos un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica. Los kits que contienen anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos, o moléculas orgánicas son útiles, por ejemplo, para ensayos de citólisis de células TAT, para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptido TAT a partir de las células. Por ejemplo, para el aislamiento y purificación de TAT, el kit puede contener un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica acoplados a esferas (por ejemplo, esferas de sefaroza). Los kits se pueden disponer conteniendo anticuerpos, oligopéptidos, o moléculas orgánicas para la detección y cuantificación de TAT *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Dicho anticuerpo, oligopéptido, o molécula orgánica útil para la detección se pueden disponer con un marcador, tal como un fluorescente o radiomarcador.

L. Artículos de fabricación y kits

[0291] También se describe aquí un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento del cáncer que expresa anti-TAT. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con el mismo. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para el tratamiento del cáncer y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica descrito aquí. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para el tratamiento del cáncer. La etiqueta o prospecto comprenderán además instrucciones para administrar una composición con el anticuerpo, el oligopéptido, o la molécula orgánica al paciente con cáncer. Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

[0292] También se describen kits que son útiles para varios objetivos, por ejemplo, para ensayos para citólisis de células que expresan TAT, para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptido TAT a partir de células. Para el aislamiento y purificación de polipéptido TAT, el kit puede contener un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica acoplada a esferas (por ejemplo, esferas de sefaroza). Los kits se pueden disponer conteniendo los anticuerpos, oligopéptidos, o moléculas orgánicas para la detección y cuantificación de polipéptido TAT *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Como con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociados con el recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende por lo menos un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido, o molécula orgánica de la invención. Se pueden incluir recipientes adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes, tampones y anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso *in vitro* o de diagnóstico pretendido.

M. Usos para polipéptidos TAT y ácidos nucleicos que codifican polipéptidos TAT

[0293] Las secuencias de nucleótidos (o sus complementos) que codifican los polipéptidos TAT tienen diferentes aplicaciones en el campo de biología molecular, incluyendo usos tales como sondas de hibridación, en la localización en cromosomas y genes y en la generación de sondas de ARN y ADN no codificante. El ácido nucleico que codifica TAT también será útil para la preparación de los polipéptidos TAT mediante técnicas recombinantes descritas aquí, donde estos polipéptidos TAT pueden ser útiles, por ejemplo, en la preparación de anticuerpos anti-TAT tal como se describen aquí.

[0294] Se puede usar el gen de TAT de secuencia nativa y longitud completa, o partes del mismo, como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el ADNc de TAT de longitud completa o para aislar otros ADNcs (por ejemplo, aquellos que codifican variantes naturales de TAT o TAT de otras especies) que tienen una identidad de secuencia deseada con la secuencia de TAT nativa descrita aquí. Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente entre 20 y aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivar de regiones por lo menos parcialmente nuevas de la secuencia de nucleótidos nativa de longitud nativa, donde estas regiones pueden determinarse sin una experimentación excesiva o partir de las secuencias genómicas incluyendo promotores, elementos potenciadores e intrones de la secuencia nativa de TAT. A modo de ejemplo, un método de cribado comprenderá aislar la región codificante del gen de TAT usando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Se pueden marcar las sondas de hibridación con una variedad de marcadores, incluyendo radionucleótidos tales como ³²P o ³⁵S o marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda mediante sistemas de acoplamiento avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la del gen de TAT de la presente solicitud se pueden usar para cribar las bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ANRm para determinar a qué miembros de estas bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen detalladamente en los Ejemplos más abajo. De manera similar se puede emplear como sonda cualquiera de las secuencias EST descritas en la presente solicitud usando los métodos descritos aquí.

[0295] Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos que codifican TAT incluyen oligonucleótidos codificantes o no codificantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico (o ARN o ADN) de cadena única capaz de unirse a las secuencias diana de ARNm de TAT (codificante) o de ADN de TAT (no codificante). Los oligonucleótidos no codificantes o codificantes, según la presente invención, comprenden un fragmento de la región codificante del ADN de TAT. Dicho fragmento generalmente comprende por lo menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente entre 14 y 30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido codificante o no codificante, en base a una secuencia de ADNc que codifica una proteína determinada se describe, por ejemplo, en Stein and Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988) y Van der Krol et al. (Bio Techniques 6:958, 1988).

[0296] La unión de oligonucleótidos codificantes o no codificantes a las secuencias de ácido nucleico diana da lugar a la formación de cadenas dobles que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana mediante uno

de una serie de medios, incluyendo la mayor degradación de las cadenas dobles, la terminación prematura de la transcripción o la traducción, o mediante otros medios. Dichos métodos se describen en la presente invención. Los oligonucleótidos no codificantes se pueden usar por tanto para bloquear la expresión de proteínas TAT, donde dichas proteínas TAT pueden jugar un papel en la inducción del cáncer en mamíferos. Los oligonucleótidos codificantes o no codificantes comprenden además oligonucleótidos que tienen esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otras uniones a azúcares, tales como las descritas en WO 91/06629) y donde dichas uniones a azúcares son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con uniones a azúcares resistentes son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática), pero retienen la especificidad de secuencia para poder unirse a las secuencias de nucleótidos diana.

[0297] Las zonas intragénicas preferidas para la unión no codificante incluyen la región que incorpora el codón de inicio/comienzo de la traducción (5'-AUG, 5'-ATG) o el codón de terminación/parada (5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UAG/5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA) del marco de lectura abierto (ORF) del gen. Estas regiones se refieren a una parte del ANRm o gen que abarca aproximadamente entre 25 y aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de inicio o terminación de la traducción. Otras regiones preferidas para la unión no codificante incluyen: intrones; exones; uniones intrón-exón; el marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que es la zona entre el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación de la traducción; la caperuza ("cap") en 5' de un ARNm que comprende un residuo de guanosina de metilado en N7 unido al residuo 5' del ANRm a través de una unión de trifosfato 5'-5' e incluye la propia estructura de caperuza en 5', así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes a la caperuza; la región 5' no traducida (5'UTC); la parte de un ANRm en la dirección 5' desde el codón de inicio de la traducción, y de este modo incluyendo nucleótidos entre el sitio de la caperuza en 5' y el codón de inicio de la traducción de un ANRm o los nucleótidos correspondientes en el gen; y la región 3' no traducida (3'UTR), la parte de un ANRm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y de este modo incluyendo los nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ANRm o los nucleótidos correspondientes en el gen.

[0298] Entre los ejemplos específicos de compuestos no codificante preferidos útiles para inhibir la expresión de proteínas TAT se incluyen oligonucleótidos que contienen esqueletos modificados o uniones entre nucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos que presentan esqueletos modificados incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en el esqueleto y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los objetivos de esta memoria, y tal como se hace referencia a veces en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto entre nucleósidos también pueden considerarse como oligonucleósidos. Entre los esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos se incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo, incluyendo 3'-alquileo fosfonatos, 5'-alquileo fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y borano-fosfatos que tienen uniones normales 3'-5', análogos de estos unidos por 2'-5', y los que tienen una polaridad invertida, donde una o más uniones entre nucleótidos son una unión 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden una única unión 3' a 3' en la unión entre nucleótidos en 3', es decir un residuo de nucleósido invertido único que puede ser básico (falta la nucleobase o tiene un grupo hidroxilo en su lugar). También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas ácidas libres. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de uniones que contienen fósforo incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 y 5,625,050.

[0299] Los esqueletos de oligonucleótidos preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos presentan esqueletos que están formados por uniones entre nucleósidos con alquilo de cadena corta o cicloalquilo, heteroátomos mezclados y uniones entre nucleósidos con alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones entre nucleósidos heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Estas incluyen aquellas que tienen uniones morfolino (formadas en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos de riboacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes con componentes N, O, S y CH₂ mezclados. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos oligonucleótidos incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 y 5,677,439.

[0300] En otros oligonucleótidos no codificantes preferidos, la unión de tanto del azúcar como entre nucleósidos, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótidos se sustituyen por grupos nuevos. Las unidades de las bases se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácidos nucleicos diana apropiado. A uno de dichos compuestos oligoméricos, un oligonucleótido mimético que se ha observado que tiene propiedades de hibridación excelentes, se hace referencia como ácido nucleico de péptido (PNA). En los compuestos PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las

nucleobases se mantienen y están unidas directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte amida del esqueleto. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos PNA incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262. Más sobre los compuestos PNA se puede encontrar en Nielsen et al, Science, 1991, 254, 1497-1500.

[0301] Los oligonucleótidos no codificantes preferidos incorporan esqueletos de fosforotioato y/o esqueletos de heteroátomos, y en particular, $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2-$ [conocido como esqueleto metilen (metilimino) o MMI], $-\text{CHO-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$ y $-\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2-$ [donde el esqueleto de fosfodiéster nativo está representado como $-\text{O-P-O-CH}_2-$] descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5,489,677 indicada anteriormente, y los esqueletos de amida de la Patente de Estados Unidos No. 5,602,240 indicada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos no codificantes que tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la Patente de Estados Unidos No. 5,034,506 indicada anteriormente.

[0302] Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más grupos azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-alquil, S-alquil, o N-alquil; O-alquénil, S-alquénil, o N-alquénil; O-alquínil, S-alquínil o N-alquínil; o O-alquil-O-alquil, donde el alquil, alquénil y alquínil pueden ser alquilo C_1 a C_{10} o alquénilo y alquínilo C_2 a C_{10} sustituidos o no sustituidos. Particularmente preferidos son $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$, y $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos no codificantes preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior de C_1 a C_{10} , alquilo inferior sustituido, alquénilo, alquínilo, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂ CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sili sustituido, un grupo divisor de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcóxialcoxi. Una modificación adicional incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir un grupo $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos siguientes, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂).

[0303] Una modificación preferida adicional incluye Ácidos Nucleicos Cerrados (LNAs) en los que el grupo 2'-hidroxilo se une al átomo de carbono 3' ó 4' del anillo de azúcar formando así un grupo de azúcares bicíclicos. La unión es preferiblemente un grupo metileno ($-\text{CH}_2-$)_n que une el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', donde n es 1 ó 2. Los LNAs y la preparación de los mismos se describen en WO 98/39352 y WO 99/14226.

[0304] Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂ NH₂), 2'-alil (2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-alil (2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación en 2' puede ser en la posición arábino (arriba) o la posición ribo (abajo). Una modificación 2'-arábino preferida es 2'-F. También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótidos 3' terminal o en oligonucleótidos unidos 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcares, tales como grupos ciclobutilo en lugar de azúcares pentofuranosilo. Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcares modificados incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; y 5,700,920.

[0305] Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo referidos en la técnica simplemente como "bases"). Tal como se utiliza aquí, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracil (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales, tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroxiometil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracil, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracil y citosina, 5-propinil ($-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$) uracil y cytosine y otros derivados alquínilo de bases pirimidínicas, 6-azo uracil, citosina y timina, 5-uracil (pseudouracil), 4-tiouracil, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquil, 8-hidroxil y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uraciles y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Nucleobases modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas, tales como fenoxazin citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), fenotiazin citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), abrazaderas G, tales como una fenoxazin citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido [5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrol[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base purínica o pirimidínica se sustituye por otros heterociclos, por ejemplo, 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Más nucleobases incluyen las descritas en la patente de Estados Unidos No. 3,687,808, las descritas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, y las descritas por Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613. Algunas de estas nucleobases son

particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la solicitud. Entre éstas se incluyen pirimidinas 5-sustituídas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracil y 5-propinilcitosina. Se ha observado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad de las dobles cadenas de ácido nucleico en 0,6-1,2 grados C. (Sanghvi et al, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son sustituciones de bases preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de los azúcares 2'-O-metoxietil. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de nucleobases modificadas incluyen, pero sin limitación, Patente de Estados Unidos No. 3,687,808, así como las Patentes de Estados Unidos No.: 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,583; 6,005,096; 5,681,941 y 5,750,692.

[0306] Otra modificación de oligonucleótidos no codificantes que se unen químicamente a uno o más grupos del oligonucleótido o conjugados que aumentan la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales, tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas informadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que aumentan las propiedades farmacodinámicas de oligómeros y grupos que aumentan las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterol, lípidos, lípidos catiónicos, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas y colorantes. Los grupos que aumentan las propiedades farmacodinámicas, en este contexto de la invención, incluye grupos que mejoran la captación del oligómero, aumentan la resistencia del oligómero a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con ARN. Los grupos que aumentan las propiedades farmacocinéticas, en este contexto de la invención, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o excreción de oligómero. Los grupos conjugados incluyen, pero sin limitación, grupos lipídicos, tales como un grupo colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilil (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolésterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, dodecandiol o residuos undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietil-amonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido acético adamantano (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un grupo palmitil (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o un grupo octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos también se pueden conjugar a sustancias farmacológica activas, por ejemplo, aspirina, warfarin, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbufeno, cetoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en las solicitudes de Patente de Estados Unidos. No. Ser 09/334,130 (presentada el 15 Junio de 1999) y las patentes de Estados Unidos Nos.: 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,243,022; 5,254,469; 3,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 3,292,873; 5,317,098; 3,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y 5,688,941.

[0307] No es necesario que todas las posiciones de un compuesto determinado se modifiquen uniformemente, y de hecho, se pueden incorporar más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente en un único compuesto o incluso en un único nucleósido en un oligonucleótido. La presente invención también incluye compuestos no codificantes que con compuestos quiméricos. Los compuestos no codificantes "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta solicitud, son compuestos no codificantes, particularmente oligonucleótidos, que contiene dos o más regiones químicamente distintas, cada una formada por lo menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótidos en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen habitualmente por lo menos una región en la que se modifica el oligonucleótido para conferir al oligonucleótido una mayor resistencia a la degradación por nucleasa, una mayor captación celular y/o una mayor afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de dividir los híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que divide la cadena de ARN de la cadena doble ARN:ADN. La activación de ARNasa H, por tanto, da lugar a la división del ARN diana, aumentando ampliamente así la eficacia de la inhibición de oligonucleótidos de la expresión génica. Consecuentemente, se pueden obtener a menudo resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se utilizan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxioligonucleótidos fosforotioato que se hibridan a la misma región diana. Los compuestos no codificantes quiméricos se pueden formar como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/o oligonucleótidos tal

como se han descrito anteriormente. Los oligonucleótidos no codificantes quiméricos preferidos incorporan por lo menos una azúcar modificado en 2' (preferiblemente 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3' terminal para conferir resistencia a la nucleasa y una región con por lo menos 4 azúcares 2'-H contiguas para conferir la actividad de ARNasa H. Dichos compuestos también se refieren en la técnica como híbridos o espaciómeros ("gapmers"). Los "gapmers" preferidos tienen una región de azúcares modificados en 2' (2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3' terminal y el extremo 5' terminal separados por lo menos una región que tiene por lo menos 4 azúcares 2'-H contiguos y preferiblemente incorporan uniones de la estructura de fosforotioato. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,978; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; S, 652,355; 5,652,356; y 5,700,922.

[0308] Los compuestos no codificantes utilizados según la presente descripción se pueden fabricar convenientemente y rutinariamente a través de la técnica conocida de la síntesis de fase sólida. El equipo para dicha síntesis es comercializado por varios vendedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Se puede utilizar, adicional o alternativamente, cualquier otro medio para dicha síntesis conocida en la técnica. Se conoce que se utilizan técnicas similares para preparar oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. Los compuestos de la invención también se pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o en cualquier caso asociarse con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, tales como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución, y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones auxiliares de captación, distribución y/o absorción incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,321,291; 5,543,158; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; y 5,595,756.

[0309] Otros ejemplos de oligonucleótidos codificante o no codificantes incluyen aquellos oligonucleótidos que están unidos covalentemente a grupos orgánicos, tales como los descritos en WO 90/10048, y otros grupos que aumentan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico diana, tal como poli-(L-lisina). Además, agentes intercalantes, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos, se pueden unir a oligonucleótidos codificantes o no codificantes para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido codificante o no codificante por la secuencia de nucleótidos diana.

[0310] Los oligonucleótidos no codificantes o codificante se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana mediante cualquier método de transferencia génica, incluyendo, por ejemplo, la electroporación de transfección de ADN mediada por CaPO₄, o mediante la utilización de vectores de transferencia génica, tales como el virus Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, se inserta un oligonucleótido no codificante o codificante en un vector retroviral adecuado. Se pone en contacto una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana con el vector retroviral recombinante, in vivo o ex vivo. Entre los vectores retrovirales adecuados se incluyen, pero sin limitación, los derivados de los retrovirus murinos M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de la doble copia designados como DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase WO 90/13641).

[0311] Los oligonucleótidos codificante o no codificantes también se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión a ligando, tal como se describe en WO 91/04753. Las moléculas de unión a ligando adecuadas incluyen, pero sin limitación, receptores de la superficie celular, factores de crecimiento, otras citoquinas u otros ligandos que se unen a receptores de la superficie celular. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de unión a ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión a ligando de unirse a su molécula o receptor correspondiente, o de bloquear la entrada del oligonucleótido codificante o no codificante o su conjugado en la célula.

[0312] Alternativamente, un oligonucleótido codificante o no codificante se puede introducir en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana mediante la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, tal como se describe en WO 90/10448. El complejo de oligonucleótido codificante o no codificante-lípido se disocia preferiblemente en la célula mediante una lipasa endógena.

[0313] Las moléculas ARN o ADN no codificante o codificantes tienen generalmente por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ó 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos de referencia más o menos 10% de esa longitud de referencia.

[0314] Las sondas se pueden emplear en técnicas de PCR para generar un grupo de secuencias para identificar

secuencias codificantes de TAT estrechamente relacionadas.

[0315] Las secuencias de nucleótidos que codifican TAT se pueden usar además para construir sondas de hibridación para la localización del gen que codifica este polipéptido TAT y para el análisis genético de individuos con alteraciones genéticas. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente invención se pueden usar para la localización de un cromosoma y regiones específicas del cromosoma usando técnicas conocidas como la hibridación *in situ*, análisis de unión frente marcadores cromosómicos conocidos y cribado de genotecas por hibridación.

[0316] Cuando las secuencias codificantes para TAT codifican una proteína que se une a otra proteína (ejemplo, cuando el TAT es un receptor), los TAT se pueden usar en análisis para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de unión. Mediante dichos métodos, se pueden identificar los inhibidores de la interacción de unión receptor/ligando. Las proteínas implicadas en dichas interacciones de unión se pueden usar además para cribar péptidos o pequeñas moléculas inhibidoras o agonistas de la interacción de unión. Además, el receptor TAT se puede utilizar para aislar el ligando o ligandos correlativos. Se pueden diseñar ensayos de cribado para encontrar compuestos guía que mimeticen la actividad biológica del polipéptido TAT nativo o un receptor para TAT. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles para un cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolas particularmente adecuadas para identificar candidatos farmacológicos de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos se pueden realizar en varios formatos, incluyendo los ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos celulares, caracterizados en la técnica.

[0317] Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido TAT o sus formas modificadas se pueden usar además para generar animales transgénicos o animales "knock out" (sin un determinado gen) que a su vez, son útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, el cual fue introducido en el animal o un ancestro del animal en una etapa prenatal, por ejemplo, en una etapa embrionaria. Un transgén es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir del cual se desarrolla un animal. En una realización, el ADNc que codifica un polipéptido TAT se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifique el polipéptido TAT según las técnicas establecidas y las secuencias genómicas usadas para generar los animales transgénicos que contienen las células que expresan el ADN que codifica el polipéptido TAT. Los procedimientos para generar animales transgénicos, particularmente animales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.736.866 y 4.870.009. Habitualmente, las células particulares serán las dianas para la incorporación de un transgén del polipéptido TAT con potenciadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica un polipéptido TAT introducido en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria se pueden usar para examinar el efecto de la expresión aumentada del ADN que codifica el polipéptido TAT. Dichos animales se pueden usar como animales de prueba para reactivos que se cree que confieren protección frente, por ejemplo, a estados patológicos asociados con su sobreexpresión. Según este aspecto de la invención, se trata un animal con el reactivo y una incidencia reducida del estado patológico en comparación con los animales sin tratar que lleven el transgén, indicaría una intervención terapéutica potencial para el estado patológico.

[0318] Alternativamente, se pueden usar homólogos no humanos de los polipéptidos TAT para construir un animal "knock out" para el polipéptido TAT que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica el polipéptido TAT como resultado de una recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido TAT y un ADN genómico alterado que codifica el polipéptido TAT introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, se puede utilizar ADNc que codifica un polipéptido TAT para clonar ADN genómico que codifica el polipéptido TAT según las técnicas establecidas. Se puede eliminar o reemplazar una porción del ADN genómico que codifica un polipéptido TAT por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador de selección que se usa para controlar la integración. Habitualmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (tanto en el extremo 5' como en el 3') [ver, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51: 503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea celular madre embrionaria (por ejemplo por electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno [ver por ejemplo, Li y col., *Cell*, 69: 915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan entonces en un blastocito de un animal (por ejemplo, ratón o rata) para formar quimeras de agregación [ver por ejemplo, Bradley, en "*Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*", (Teratocarcinomas y células troncales embrionarias: Un enfoque práctico), E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), págs 113-125]. Un embrión quimérico se puede después implantar en un animal de cría hembra pseudopreñada adecuada y el embrión nace para crear un animal "knock out". La progenie que porta el ADN recombinado homológamente en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas habituales y se puede usar para criar animales en los que todas las células del animal contengan el ADN recombinado homológamente. Los animales "knock out" se pueden caracterizar por ejemplo, por su capacidad de defenderse frente ciertos estados patológicos y por su desarrollo de estados patológicos debido a la ausencia del polipéptido TAT.

[0319] El ácido nucleico que codifica los polipéptidos TAT también se pueden utilizar en terapia génica. En las aplicaciones de terapia génica, se introducen los genes en células con el fin de conseguir la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la sustitución de un gen defectuoso. "Terapia génica" incluye tanto la terapia génica convencionales en la que se consigue un efecto duradero mediante un único tratamiento, como la administración de agentes terapéuticos génicos, lo cual implica la administración de una vez o

repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Se pueden utilizar ARNs o ADNs no codificantes como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. Se ha observado que se pueden importar oligonucleótidos no codificantes cortos en células en las que actúan como inhibidores, a pesar de sus concentraciones intracelulares bajas causadas por su captación limitada por la membrana celular. (Zamenick et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos se pueden modificar para aumentar su captación, por ejemplo, mediante la sustitución de sus grupos fosfodiéster cargados negativamente por grupos no cargados.

[0320] Existen una serie de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Entre las técnicas actuales de transferencia de genes *in vivo* preferidas se incluyen la transfección con vectores virales (habitualmente retrovirales) y transfección mediada por liposomas recubiertos de proteína viral (Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones, es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que reconoce las células diana, tales como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se utilizan liposomas, se pueden utilizar proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada con endocitosis para el reconocimiento y/o facilitar la captación de, por ejemplo, proteínas cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo de célula concreta, anticuerpos para proteínas que experimentan la internalización en el ciclo, y proteínas que dirigen la localización intracelular y aumentan la vida media intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor es descrita, por ejemplo, por Wu et al., J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987); y Wagner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de marcaje génico y terapia génica, véase Anderson et al., Science 256: 808-813 (1992).

[0321] Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos TAT o fragmentos de los mismos descritos en la presente invención son útiles para la identificación de cromosomas. En este aspecto, existe una necesidad actual para identificar nuevos marcadores cromosómicos, ya que, en base a los datos de secuencias reales, existen actualmente relativamente pocos reactivos marcadores cromosómicos. Cada molécula de ácido nucleico de TAT de la presente invención se puede utilizar como marcador cromosómico.

[0322] Los polipéptidos TAT y las moléculas de ácido nucleico también se pueden utilizar para el diagnóstico de la tipificación del tejido, donde los polipéptidos TAT de la presente invención se pueden expresar diferencialmente en un tejido en comparación con otro, preferiblemente en un tejido enfermo en comparación con tejido normal del mismo tipo de tejido. Las moléculas de ácido nucleico de TAT serán útiles para generar sondas para PCR, análisis Northern, análisis Southern y análisis Western.

[0323] Se describen aquí métodos de cribado de compuestos para identificar aquellos compuestos que mimetizan el polipéptido TAT (agonistas) o prevenir el efecto del polipéptido TAT (antagonistas). Los ensayos de cribado de fármacos candidatos antagonistas están diseñados para identificar compuestos que se unen o forman complejos con los polipéptidos TAT codificados por los genes identificados aquí, o de otro modo interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares, incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la expresión de polipéptido TAT a partir de células. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para la identificación de pequeñas moléculas como fármacos candidatos.

[0324] Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de unión de proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímicos, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

[0325] Todos los ensayos tienen en común que requieren el contacto del fármaco candidato con un polipéptido TAT codificado por un ácido nucleico aquí identificado en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interaccionen.

[0326] En ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido TAT codificado por el gen identificado aquí o el fármaco candidato se inmovilizan sobre una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se realiza mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido TAT y dejándolo secar. Alternativamente, puede utilizarse un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido TAT a ser inmovilizado para fijarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede estar marcado con un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente fijado. Cuando la reacción se ha completado, se eliminan los componentes que no han reaccionado, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos fijados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado transporta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que el complejo se ha formado. Cuando el componente originalmente no

inmovilizado no transporta un marcador, se puede detectar la formación del complejo, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

[0327] Si el compuesto candidato interacciona pero no se une a un polipéptido TAT particular codificado por un gen identificado aquí, su interacción con este polipéptido puede ser analizada mediante procedimientos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen estrategias tradicionales, tales como el entrecruzamiento, la coimmunoprecipitación, y la copurificación a través de gradientes o en columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden controlarse utilizando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores [Fields and Song, *Nature*, 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)] como se describe en Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5789-5793 (1991)]. Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levaduras descrito en las publicaciones antes mencionadas (generalmente denominados como "sistema del doble híbrido") aprovecha esta propiedad, y utiliza dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1/*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4, depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interaccionan se detectan con un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa. Existe un kit completo (MATCHMAKER™) disponible comercialmente por Clontech para la identificación de interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica del doble híbrido. Este sistema también puede extenderse para localizar dominios proteicos implicados en interacciones proteicas específicas, así como para señalar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

[0328] Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido TAT identificado aquí y otros componentes intra o extracelulares pueden ser analizados tal como se indica a continuación: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo para permitir la interacción y la unión de los dos productos. Para analizar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y en presencia del compuesto a analizar. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción para utilizarse como control positivo. La unión (formación del complejo) entre el compuesto a analizar y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se controla tal como se describió anteriormente. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción, que contiene el compuesto a analizar indica que el compuesto a analizar interfiere con la interacción del compuesto a analizar y su pareja de reacción.

[0329] Para analizar antagonistas, el polipéptido TAT puede añadirse a una célula junto con el compuesto a cribar por una actividad particular y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido TAT indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido PRO. Alternativamente, se pueden detectar antagonistas mediante la combinación del polipéptido TAT y un potencial antagonista con receptores del polipéptido TAT unidos a membrana o receptores recombinantes bajo condiciones adecuadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido TAT puede marcarse, mediante, por ejemplo, radioactividad, de manera que el número de moléculas del polipéptido TAT unidas al receptor pueden usarse para determinar la eficacia del potencial antagonista. El gen que codifica el receptor puede identificarse mediante numerosos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, cribado ("panning") de ligandos y separación por FACS. Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): capítulo 5(1991). Preferiblemente, se emplea la clonación de expresión donde se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula sensible al polipéptido TAT y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en grupos y se usa para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido PRO. Las células transfectadas que crecen en portaobjetos de cristal se exponen al polipéptido TAT marcado. El polipéptido TAT puede marcarse mediante distintos medios incluyendo la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica para un sitio. Tras la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a un análisis autorradiográfico. Los grupos positivos se identifican y se preparan subgrupos y se retransfectan usando un proceso interactivo de subagrupamiento y recribado, que finalmente producen un único clon que codifica el receptor putativo.

[0330] Como estrategia alternativa para la identificación de un receptor, el polipéptido TAT marcado puede unirse por fotoafinidad con preparaciones de membrana o extractos celulares que expresan la molécula receptora. El material entrecruzado se resuelve por PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor puede cortarse, separarse en pequeños fragmentos y someterse a microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida por microsecuenciación se utilizaría para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degenerados para cribar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el receptor putativo.

[0331] En otro ensayo para antagonistas, se incubarán células de mamífero o una preparación de membrana que expresan el receptor con el polipéptido TAT marcado en presencia del compuesto candidato. A continuación, se podría medir la capacidad del compuesto de aumentar o bloquear esta interacción.

[0332] Ejemplos más específicos de potenciales antagonistas incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones

de inmunoglobulina con el polipéptido TAT y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos antiidiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un potencial antagonista puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido TAT que reconozca el receptor, pero que no ejerza ningún efecto, inhibiendo así competitivamente la acción del polipéptido TAT.

[0333] Otro antagonista potencial del polipéptido TAT es una construcción de ARN o ADN no codificante preparada usando la tecnología no codificante, donde, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN no codificante actúa bloqueando directamente la traducción de ARNm mediante la hibridación con el ARNm diana y evitando la traducción de la proteína. La tecnología no codificante puede usarse para controlar la expresión génica a través de la formación de una triple hélice o del ADN o ARN no codificante, ambos procedimientos basados en la unión de un polinucleótido al ADN o al ARN. Por ejemplo, la región codificante 5' de la secuencia de polinucleótidos, que codifica el polipéptido TAT maduro de la presente invención se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN no codificante de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice- véase, Lee et al., Nucl. Acids Res., 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science, 241:456 (1988); Dervan et al., Science, 251:1360 (1991)], evitando así la transcripción y la producción del polipéptido TAT. El oligonucleótido de ARN no codificante se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido TAT (no codificante-Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expresión (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente pueden también liberarse a células, de manera que el ARN o ADN no codificante puede ser expresado *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido TAT. Cuando se usa un ADN no codificante, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del la región de inicio de la traducción, por ejemplo, entre las posiciones de aproximadamente -10 a +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

[0334] Los antagonistas potenciales incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio activo, el sitio de unión del receptor, o el factor de crecimiento u otro sitio de unión relevante del polipéptido TAT, bloqueando de este modo la actividad biológica normal del polipéptido TAT. Entre los ejemplos de moléculas pequeñas se incluyen, pero sin limitación, péptidos o moléculas de tipo péptido pequeñas, preferiblemente péptidos solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

[0335] Los ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar la escisión específica del ARN. Las ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Los sitios de escisión específicos de ribozimas en un ARN diana potencial se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Para más detalles, véase, por ejemplo, Rossi, Current Biology, 4: 469-471 (1994), y la publicación PCT No. WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre 1997).

[0336] Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción deberían ser de cadena sencilla y compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que provoca la formación de una triple hélice a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, lo cual requiere generalmente tramos ajustables de purinas o pirimidinas en una cadena de una cadena doble. Para más detalles, véase, por ejemplo, la publicación PCT No. WO 97/33551, supra.

[0337] estas moléculas pequeñas se pueden identificar mediante uno o más de los ensayos de cribado descritos anteriormente y/o mediante cualquiera otra técnica de cribado conocida para los expertos en la materia.

[0338] El ácido nucleico codifica el polipéptido TAT se puede utilizar aquí para la producción recombinante de polipéptido TAT utilizando técnicas conocidas en el sector y tal como se describen aquí. A su vez, los polipéptidos TAT producidos se pueden utilizar para generar anticuerpos anti-TAT utilizando técnicas conocidas en el sector y tal como se describen aquí.

[0339] Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido TAT identificado aquí, así como otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado descritos anteriormente aquí, se pueden administrar para el tratamiento de varios trastornos, incluyendo cáncer, en forma de composiciones farmacéuticas.

[0340] Si el polipéptido TAT es intracelular se utilizan anticuerpos completos como inhibidores, se prefieren anticuerpos de internalización. Sin embargo, también se pueden utilizar lipofecciones o liposomas para liberar el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo en las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se una específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que mantienen la capacidad de unirse a la secuencia proteica diana. Dichos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producir mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

[0341] La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad concretar a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Alternativamente o adicionalmente, la composición puede comprender un

agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, una citoquina, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

[0342] Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos.

5 **EJEMPLOS**

[0343] Los reactivos comercialmente disponibles a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron según las instrucciones del fabricante a menos que se indicara lo contrario. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos y a lo largo de la memoria por los números de acceso ATCC es de la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

10 **EJEMPLO 1: Perfil de expresión en tejidos utilizando GeneExpress®**

[0344] Se analizó una base de datos privada que contenía información de la expresión génica (GeneExpress®, GeneLogic Inc., Gaithersburg, MD) en un intento por identificar polipéptidos (y sus ácidos nucleicos codificantes), cuya expresión se favorece y se detecta significativamente en un tejido o tejidos tumorales humanos particulares de interés en comparación con otros tumor o tumores humanos y/o tejidos humanos normales. Específicamente, se realizó un análisis de la base de datos GeneExpress® utilizando el software disponible de Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD, para su uso con la base de datos GeneExpress® o con el software privado escrito y desarrollado en Genentech, Inc. para su uso con la base de datos GeneExpress®. La tasa de positivos en el análisis se basa en varios criterios incluyendo, por ejemplo, la especificidad de tejido, la especificidad de tumor y el nivel de expresión en tejidos esenciales normales y/o tejidos proliferativos normales. La siguiente molécula o moléculas muestran un perfil de expresión de tejido que muestra una expresión de tejido elevada y un favorecimiento significativo y reproduciblemente detectable de la expresión en un tumor o tumores humanos específicos en comparación con otro tumor o tumores humanos y/o tejidos normales humanos y opcionalmente una expresión relativamente baja en tejidos humanos esenciales normales y/o tejidos proliferativos humanos normales.

[0345] Utilizando el análisis de expresión descrito anteriormente, se determinó que el ARNm que codifica el polipéptido TAT10772 se sobreexpresa de manera significativa, reproducible y detectable en ciertos tipos de tumores cancerosos humanos de ovario, mama y páncreas en comparación con los correspondientes tejidos humanos normales de ovario, mama y páncreas, respectivamente.

A. Ovario

[0346] En un primer experimento, se analizó la expresión de TAT10772 en un grupo de 89 muestras independientes de tejido de ovario humano normal. Los resultados de estos análisis demostraron que el nivel de expresión de ARNm de TAT10772 en todas las muestras de tejido de ovario humano normal fue sorprendentemente concordante y se encontraba en una distribución muy estrecha, con ninguna muestra de tejido de ovario humano normal mostrando más de un incremento de 6 veces en la expresión de TAT10772 en comparación con el nivel promedio de expresión de TAT10772 para el grupo de muestras de forma global.

[0347] Para fines de comparación cuantitativa, también se analizaron una variedad de tipos de muestras independientes y diferentes de tejido de ovario humano canceroso para la expresión de TAT10772. Los resultados obtenidos a partir de estos análisis demostraron que el nivel de expresión de TAT10772 en las muestras cancerosas era bastante variable, mostrando un número significativo de las muestras cancerosas un incremento de por lo menos 6 veces (hasta un máximo de aproximadamente 580 veces) en la expresión de TAT10772 en comparación con el nivel promedio de expresión de TAT10772 para el grupo de muestras de tejido de ovario normal analizado. Más específicamente, se observó una sobreexpresión de TAT10772 detectable y reproducible para los siguientes tipos de cáncer de ovario en comparación con ovario normal (donde los número mostrados entre paréntesis para cada tipo de cáncer representan el número de muestras independientes que mostraron un incremento de por lo menos 6 veces en la expresión de TAT10772 cuando se comparó con el nivel promedio de la expresión de TAT10772 para el grupo de muestras de tejido de ovario normal analizadas/el número total de muestras independientes de tumor analizadas): adenocarcinoma de endometrio (13/17), cistodenocarcinoma seroso, incluyendo adenocarcinoma papilar (52/57) y adenocarcinoma de células claras (7/10). Se realizaron experimentos adicionales que confirmaron estos resultados.

B. Mama

[0348] En otro experimento, se analizó la expresión de TAT10772 en un grupo de 22 muestras independientes de tejido de mama humana normal. Los resultados de estos análisis demostraron que el nivel de expresión de ARNm de TAT10772 en todas las muestras de tejido de mama humana normal analizadas fue sorprendentemente concordante y se encontraba en una distribución muy estrecha, con ninguna muestra de tejido de mama humana normal mostrando más de un incremento de 2 veces en la expresión de TAT10772 en comparación con el nivel promedio de expresión de TAT10772 para el grupo de muestras de forma global.

[0349] Para fines de comparación cuantitativa, también se analizaron 209 muestras de carcinomas ductales

infiltrantes de HER-2 negativo del tejido de mama humana para la expresión de TAT10772. Los resultados obtenidos a partir de estos análisis demostraron que el nivel de expresión de TAT10772 en las muestras cancerosas era bastante variable, con 76 de las 209 muestras analizadas mostrando un incremento de por lo menos 2 veces (hasta un máximo de aproximadamente 15 veces) en la expresión de TAT10772 cuando se comparó con el nivel promedio de expresión de TAT10772 para el grupo de muestras de tejido de mama normal analizado.

C. Páncreas

[0350] En otro experimento, se analizó la expresión de TAT10772 en un grupo de 51 muestras independientes de tejido de páncreas humano normal. Los resultados de estos análisis demostraron que el nivel de expresión de ARNm de TAT10772 en todas las muestras de tejido de páncreas humano normal analizadas fue sorprendentemente concordante y se encontraba en una distribución muy estrecha, con ninguna muestra de tejido de páncreas humano normal mostrando más de un incremento de 2 veces en la expresión de TAT10772 en comparación con el nivel promedio de expresión de TAT10772 para el grupo de muestras de forma global.

[0351] Para fines de comparación cuantitativa, también se analizaron 65 muestras independientes de tejido de adenocarcinoma pancreático humano para la expresión de TAT10772. Los resultados obtenidos a partir de estos análisis demostraron que el nivel de expresión de TAT10772 en las muestras cancerosas era bastante variable, con 33 de las 65 muestras analizadas mostrando un incremento de por lo menos 2 veces (hasta un máximo de aproximadamente 21 veces) en la expresión de TAT10772 cuando se comparó con el nivel promedio de expresión de TAT10772 para el grupo de muestras de tejido de páncreas normal analizado.

[0352] De acuerdo con lo anterior, el polipéptido TAT10772, y el ácido nucleico que codifica ese polipéptido, son excelentes dianas que se pueden aprovechar para la determinación cuantitativa y cualitativa del nivel de expresión del polipéptido TAT10772 y el ARNm que lo codifica, en varias muestras de tejido de mamífero, permitiendo así que se hagan comparaciones cuantitativas y cualitativas entre ellas. Por lo tanto, el polipéptido TAT10772, y el ácido nucleico que codifica ese polipéptido, son moléculas cuyo perfil de expresión único se puede aprovechar para el diagnóstico de ciertos tipos de tumores cancerosos en mamíferos tal como se ha descrito anteriormente. Además, ya que este análisis demuestra que el polipéptido TAT10772 se sobreexpresa de manera significativa, reproducible y detectable en ciertos tumores humanos en comparación con sus correspondientes tejidos humanos, el polipéptido TAT10772 sirve como una diana excelente que se puede aprovechar para el tratamiento terapéutico de dichos tumores en mamíferos.

EJEMPLO 2: Análisis por microarray para detectar el favorecimiento de la expresión de polipéptidos TAT en tumores cancerosos

[0353] Los microarrays de ácidos nucleicos, que contienen a menudo miles de secuencias de genes, son útiles para identificar genes expresados diferencialmente en tejidos enfermos en comparación con sus equivalentes normales. Utilizando microarrays de ácidos nucleicos, las muestras de ARNm de análisis y control de las muestras de tejido de análisis y control se transcriben de manera inversa y se marcan para generar sondas de ADNc. A continuación, las sondas de ADNc se hibridan a un array de ácidos nucleicos inmovilizados en un soporte sólido. El array se configura de manera que la secuencia y la posición de cada miembro del array son conocidas. Por ejemplo, se pueden disponer en arrays una selección de genes conocidos por expresarse en ciertos estados patológicos en un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro del array particular indica que la muestra de la que derivaba a sonda expresa ese gen. Si la señal de hibridación de una sonda de una muestra de análisis (tejido enfermo) es mayor que la señal de hibridación de una sonda de una muestra de control (tejido normal), se identifican el gen o genes sobreexpresados en el tejido enfermo. La implicación de este resultado es que una proteína sobreexpresada en un tejido enfermo es útil no sólo como marcador de diagnóstico para la presencia de la condición patológica, sino también como una diana terapéutica para el tratamiento de la condición patológica.

[0354] La metodología de hibridación de ácido nucleicos y la tecnología de microarray son bien conocidas en la técnica. En el presente ejemplo, la preparación específica de ácidos nucleicos para la hibridación y sondas, portamuestras y las condiciones de hibridación se detallan todos en WO 01/75166.

[0355] En el presente ejemplo, se estudiaron los tumores cancerosos de diferentes tipos de tejido por el favorecimiento de la expresión génica en relación con tumores cancerosos de diferentes tipos de tejido y/o tejidos humanos no cancerosos en un intento por identificar aquellos polipéptidos que se sobreexpresan en un tumor o tumores cancerosos particulares. En ciertos experimentos, se obtuvieron tejido tumoral humano canceroso y tejido tumoral humano no canceroso del mismo tipo de tejido (a menudo del mismo paciente) y se analizó la expresión del polipéptido TAT. Adicionalmente, se obtuvo el tejido tumoral humano canceroso de un conjunto de diversos tumores humanos diferentes y se comparó con una muestra de control epitelial "universal" que se preparó mediante el agrupamiento de tejidos humanos no cancerosos de origen epitelial, incluyendo hígado, riñón y pulmón. El ARNm aislado de los tejidos agrupados representa una mezcla de productos génicos expresados de varios tejidos epiteliales diferentes, proporcionando así un control negativo excelente contra el que se comparan cuantitativamente los niveles de expresión génica en tumores de origen epitelial. Los experimentos de hibridación en microarray utilizando las muestras de control agrupadas generaron una representación lineal en un análisis de 2 colores. La pendiente de la línea generada en el análisis a 2 colores se utilizó a continuación para normalizar las proporciones

de (detección análisis:control) en cada experimento. Las proporciones normalizadas de varios experimentos se compararon a continuación y se utilizaron para identificar agrupaciones de expresión génica. De este modo, la muestra de "control universal" agrupada no sólo permitía determinaciones eficaces de la expresión génica relativa en una comparación simple de 2 muestras, sino que también permitía comparaciones con múltiples muestras a través de varios experimentos.

[0356] En los presentes experimentos, se utilizaron sondas de ácidos nucleicos derivados de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido TAT descrito aquí en la creación del microarray y se utilizó el ARN de varios tejidos tumorales para la hibridación al mismo. Se designó un valor basado en la proporción normalizada:proporción experimental como la "proporción de corte". Sólo los valores que estaban por encima de esta proporción de corte se determinaron como significantes. La significancia de las proporciones se estimó a partir de la cantidad de ruido o dispersión asociados a cada experimento, pero normalmente se utilizó una proporción de corte de 1,8 veces-2 veces o superior para identificar genes candidatos relativamente sobreexpresados en muestras de tumores en comparación con el correspondiente control de tejido normal y/o control universal epitelial normal agrupado. Las proporciones para genes identificados de esta manera como relativamente sobreexpresados en muestras de tumores variaban de 2 veces a 40 veces, o incluso superior. Por comparación, en un experimento de control en que se marcó el mismo ARN en cada color y se hibridó contra sí mismo, para prácticamente todos los genes con señales por encima de la base, la proporción observada es significativamente inferior a 1,8 veces. Esto indica que el ruido experimental por encima de una proporción de 1,8 veces es extremadamente bajo, y que el cambio de veces observado de 1,8 veces o superior es significativo y se espera que represente una diferencia real, detectable y reproducible en la expresión entre las muestras analizadas y comparadas.

[0357] Los resultados de estos experimentos demostraron que el ARNm que codificaba el polipéptido TAT10772 se sobreexpresa de manera significativa (es decir, por lo menos 2 veces) en 8 de 10 muestras independientes de tumor de ovario humano analizadas cuando se compararon tanto con tejido de ovario humano normal como la muestra de control epitelial agrupada. Estos datos también demuestran que la sobreexpresión observada es significativa, detectable y reproducible a lo largo de las múltiples muestras de tumor de ovario humano cuando se compararon tanto con las muestras homólogas de ovario humano normal, como con la muestra de control epitelial humana agrupada. Tal como se ha descrito anteriormente, estos datos demuestran que el polipéptido TAT10772 de la presente invención, y el ácido nucleico codificante, son útiles no sólo como marcadores de diagnóstico para la presencia de tumores de ovario humano, pero también sirven como potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de estos tumores en humanos.

EJEMPLO 3: Análisis cuantitativo de la expresión de ARNm de TAT

[0358] En este ensayo, se utilizaron un ensayo de 5' nucleasa (por ejemplo, TaqMan®) y PCR cuantitativa a tiempo real (por ejemplo, ABI Prism 7700 Sequence Detection System® (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA)), para encontrar genes que se sobreexpresan significativamente en un tumor o tumores cancerosos en comparación con otros tumores cancerosos o tejidos no cancerosos normales. La reacción del ensayo de 5' nucleasa es una técnica basada en PCR fluorescente que utiliza la actividad de 5' exonucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa para controlar la expresión génica a tiempo real. Se utilizan dos cebadores de oligonucleótidos (cuyas secuencias se basan en el gen o la secuencia EST de interés) para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Se diseña un tercer oligonucleótido, o sonda, para detectar la secuencia de nucleótidos localizada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extendible por la enzima Taq ADN polimerasa, y se marca con un colorante fluorescente informador y un colorante fluorescente desactivador. Cualquier emisión inducida por láser del colorante informador es desactivada por el colorante desactivador cuando los dos colorantes se encuentran próximos al estar en la sonda. Durante la reacción de amplificación con PCR, la enzima Taq ADN polimerasa divide la sonda de una forma dependiente de la plantilla. Los fragmentos de la sonda resultantes se disocian en solución y la señal del colorante informador liberado está libre del efecto desactivador del segundo fluoróforo. Se libera una molécula del colorante informador para cada nueva molécula sintetizada y la detección del colorante informador no desactivado proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos. Este ensayo es conocido y se utiliza de forma adecuada en la técnica para identificar cuantitativamente las diferencias en la expresión génica entre dos muestras de tejido humano diferentes, véase, por ejemplo, Higuchi et al., *Biotechnology* 10:413-417 (1992); Livak et al., *PCR Methods Appl.*, 4: 357-362 (1995); Heid et al., *Genome Res.* 6:986-994 (1996); Pennica et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(25): 14717-14722 (1998); Pitti et al., *Nature* 396(6712):699-703 (1998) y Bieche et al., *Int. J. Cancer* 78:661-666 (1998).

[0359] El procedimiento de 5' nucleasa se desarrolla en un dispositivo de PCR cuantitativo a tiempo real, tal como el ABI Prism 7700 Sequence Detection. El sistema consiste en un termociclador, un láser, una cámara de dispositivo acoplado por carga (CCD) y un ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por láser se recoge a tiempo real a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos y se detecta en el CCD. El sistema incluye software para desarrollar el instrumento y para analizar los datos.

[0360] El material de partida para el cribado fue ARNm aislado de un conjunto de diferentes tejidos cancerosos. El ARNm se cuantifica de manera exacta, por ejemplo, fluorométricamente. Como control negativo, el ARN se aisló de diversos tejidos normales del mismo tipo de tejido que los tejidos cancerosos de análisis. A menudo, la muestra o

muestras de tumores se comparan directamente con una muestra o muestras normales “emparejadas” del mismo tipo de tejido, lo que significa que la muestra o muestras de tumor o normales se obtienen del mismo individuo.

[0361-2] Los datos del ensayo de la 5' nucleasa se expresan inicialmente como Ct, o ciclo umbral. Éste se define como el ciclo en el que la señal informadora se acumula por encima del nivel base de fluorescencia. Los valores ΔCt se utilizan como medida cuantitativa del número relativo de copias de partida de una secuencia diana particular en una muestra de ácido nucleico cuando se comparan los resultados del ARNm del cáncer con los resultados de ARNm humano normal. Como una unidad Ct corresponde a 1 ciclo de PCR o aproximadamente a un incremento relativo de 2 veces en relación al normal, dos unidades corresponden a un incremento relativo de 4 veces, 3 unidades corresponden a un incremento relativo de 8 veces y así sucesivamente, se puede medir cuantitativamente el incremento relativo de veces en la expresión de ARNm entre dos o más tejidos diferentes. En este aspecto, se acepta en la técnica que este ensayo es suficientemente técnicamente sensible para detectar de manera reproducible un incremento de por lo menos 2 veces en la expresión de ARNm en una muestra de tumor humana en relación con el control normal.

[0363] Utilizando esta técnica, se determinó que el ARNm que codificaba el polipéptido TAT10772 se sobreexpresa de manera significativa y reproducible (es decir, por lo menos 2 veces) en 9 de 10 muestras de tumor de ovario humano independiente cuando se compararon tanto con muestras de ovario normal de diferentes donantes de tejido humano como de varias muestras de tumor de ovario normal “emparejadas” derivadas del mismo donante de tejido humano del que derivaba la muestra o muestras de tumor. Tal como se ha descrito anteriormente, estos datos demuestran que el polipéptido TAT10772 de la presente invención y el ácido nucleico codificante, son útiles no sólo como marcadores de diagnóstico para la presencia de tumores de ovario humano, sino también sirven como dianas terapéuticas potenciales para el tratamiento de estos tumores en humanos.

EJEMPLO 4: Hibridación *in situ*

[0364] La hibridación *in situ* es una técnica potente y versátil para la detección y localización de secuencias de ácidos nucleicos en preparaciones de células o tejido. Puede ser útil, por ejemplo, para identificar sitios de expresión génica, analizar la distribución en el tejido de la transcripción, identificar y localizar la infección viral, seguir los cambios en la síntesis de ARNm específico y ayudar en la localización de los cromosomas.

[0365] La hibridación *in situ* se llevó a cabo siguiendo una versión optimizada del protocolo por Lu y Gillett, *Cell Vision* 1: 169-176 (1994)), utilizando ribosondas marcadas con ^{33}P generadas por PCR. Brevemente, se seccionaron tejidos humanos bañados en parafina y fijados a formalina, se desparafinaron, se desproteinaron en proteinasa K (20 g/ml) durante 15 minutos a 37°C, y se procesaron posteriormente para una hibridación *in situ* tal y como se describe por Lu y Gillett, *supra*. Se generó una ribosonda no codificante marcada con [^{33}P] UTP a partir de un producto de PCR y se hibridó a 55°C durante toda la noche. Los portaobjetos se sumergieron en una emulsión nuclear de rastreo Kodak NTB2 y se expusieron durante 4 semanas.

Síntesis de ribosondas con ^{33}P

[0366] Se secaron con concentradores centrífugos de tipo Speed-Vac 6,0 μl (125 mCi) de ^{33}P -UTP (Amersham BF 1002, SA < 2000 Ci/mol). A cada tubo que contenía ^{33}P -UTP secado, se añadieron los siguientes ingredientes:

2,0 μl 5x de tampón de transcripción

1,0 μl de DTT (100 mM)

2,0 μl de mezcla de NTP (2,5 mM: 10 μl ; cada uno de 10 mM de GTP, CTP y ATP + 10 μl de H_2O)

1,0 μl de UTP (50 μM)

1,0 μl RNAsina

1,0 μl de molde de ADN (1 μg)

1,0 μl de H_2O

1,0 μl de ARN polimerasa (para productos de PCR T3 = AS, T7 = S, normalmente)

[0367] Los tubos se incubaron a 37°C durante una hora. Se añadieron 1,0 μl de RQ1 ADNasa, seguido de incubación a 37°C durante 15 minutos. Se añadieron 90 μl de TE (Tris 10 mM pH 7,6/1 mM EDTA pH 8,0), y la mezcla se pipeteó sobre papel DE81. La solución remanente se cargó en una unidad de ultrafiltración Microcon-50, y se centrifugó utilizando el programa 10 (6 minutos). La unidad de filtración se invirtió sobre un segundo tubo y se centrifugó utilizando el programa 2 (3 minutos). Después de la centrifugación final de recuperación, se añadieron 100 μl de TE. A continuación, se pipeteó 1 μl del producto final sobre papel DE81 y se contaron en 6 ml de Biofluor II.

[0368] La sonda se extendió sobre un gel de TBE/urea. Se añadieron 1-3 μl de la sonda o 5 μl de ARN MrkII a 3 μl

de tampón de carga. Después de calentar sobre un bloque de calor a 95°C durante 3 minutos, la sonda se colocó inmediatamente sobre hielo. Los pocillos del gel se nivelaron, se cargó la muestra y se operó a 180-245 voltios durante 45 minutos. El gel se envolvió en un envoltorio de plástico y se expuso a una película XAR con una pantalla intensificadora en un congelador a -70°C desde una hora hasta toda la noche.

5 Hibridación de ³³-P

A. Pretratamiento de las secciones congeladas.

[0369] Los portaobjetos se extrajeron del congelador, se colocaron sobre bandejas de aluminio y se descongelaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las bandejas se colocaron en una incubadora a 55°C durante cinco minutos para reducir la condensación. Los portaobjetos se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído al 4% sobre hielo en la campana de extracción, y se lavaron en 0,5 x SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente (25 ml 20 x SSC + 975 ml H₂O SQ). Después de la desproteinación en 0,5 µg/ml de proteinasa K durante 10 minutos a 37°C (12,5 µl de 10 mg/ml de reserva en 250 ml de tampón de ARNasa sin ARNasa precalentado), las secciones se lavaron en 0,5 x SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se deshidrataron en etanol al 70%, 95%, 100% durante 2 minutos cada una.

15 B. Pretratamiento de las secciones bañadas en parafina.

[0370] Los portaobjetos se desparafinaron, se colocaron en H₂O SQ, y se enjuagaron dos veces en 2 x SSC a temperatura ambiente, durante 5 minutos cada vez. Las secciones se desproteinaron en 20 µg/ml de proteinasa K (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNasa sin ARNasa; 37°C, 15 minutos) para tejido de embrión humano, u 8 x proteinasa K (100 µl en 250 ml de tampón de ARNasa, 37°C, 30 minutos) para tejidos en formalina. El posterior aclarado en 0,5 x SSC y deshidratación se llevaron a cabo tal y como se ha descrito anteriormente.

C. Prehibridación.

[0371] Los portaobjetos se dispusieron en una caja de plástico recubierta por tampón de Caja (4 x SSC, formamida al 50%). El papel de filtro se saturó.

D. Hibridación.

25 [0372] Se calentaron a 95°C durante 3 minutos 1,0 x 10⁶ cpm de sonda y 1,0 µl de ARNt (50 mg/ml reserva) por portaobjeto. Los portaobjetos se enfriaron sobre hielo, y se añadieron 48 µl de tampón de hibridación por portaobjeto. Después de centrifugar, se añadieron 50 µl de una mezcla de ³³P a 50 µl de prehibridación en el portaobjetos. Los portaobjetos se incubaron durante toda la noche a 55°C.

E. Lavados.

30 [0373] El lavado se realizó 2 veces durante 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a temperatura ambiente (400 ml de 20 x SSC + 16 ml de EDTA 0,25 M, V_f=4 L), seguido de un tratamiento con ARNasaA a 37°C durante 30 minutos (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNasa = 20 µg/ml). Los portaobjetos se lavaron 2 veces durante 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a temperatura ambiente. Las condiciones de lavado de astringencia fueron las siguientes: 2 horas a 55°C, 0,1 x SSC, EDTA (20 ml 20 x SSC + 16 ml de EDTA, V_f=4 L).

35 F. Oligonucleótidos

[0374] – El análisis in situ se realizó sobre un conjunto de secuencia de ADN descritas aquí. Los oligonucleótidos utilizados para estos análisis se obtuvieron para que fueran complementarias a los ácidos nucleicos (o complementos de los mismos) tal como se muestran en las figuras que se acompañan.

G. Resultados

40 [0375] Con respecto a la expresión de TAT10772 en tejidos humanos normales, se observa una intensa expresión en mucosa bronquial y glándulas de submucosa. Sin embargo, todos los otros tejidos humanos normales son negativos para la expresión de TAT10772. En cambio, la expresión intensa de TAT10772 se observa en 13 de 15 tumores de ovario humano analizados (adenocarcinoma y tumores epiteliales de superficie). Adicionalmente, la expresión intensa de TAT10772 también se observa en 8 de 9 adenocarcinomas uterinos humanos.

45 EJEMPLO 5: Preparación de anticuerpos que se unen a TAT10772

[0376] Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a TAT10772.

50 [0377] Técnicas para la producción de los anticuerpos monoclonales son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Goding, *supra*. Los inmunógenos que pueden ser utilizados incluyen TAT purificado, proteínas de fusión que contienen TAT, y células que expresan TAT recombinantes en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse por parte de un experto, sin gran experimentación

[0378] Los ratones, tales como ratones Balb/c, son inmunizados con el inmunógeno TAT emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyectan por vía subcutánea o por vía intraperitoneal en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno es emulsionado en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Investigation, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de las patas traseras del animal. Los ratones inmunizados se refuerzan a continuación de 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. Posteriormente, durante varias semanas, los ratones también pueden ser reforzados con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero pueden ser obtenidas de forma periódica de los ratones por sangrado retro-orbital para realizar pruebas en ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-TAT.

[0379] Después de que se haya detectado un título de anticuerpos adecuados, los animales "positivos" para anticuerpos pueden ser inyectados con una inyección intravenosa final de TAT. Tres a cuatro días más tarde, los ratones son sacrificados y se recogen las células del bazo. Las células del bazo a continuación se fusionan (utilizando un 35% de polietilenglicol) a una línea celular seleccionada de mieloma murino, tal como P3X63AgU.1, disponible en ATCC, CRL No. 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que pueden a continuación colocarse en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células del bazo.

[0380] Las células del hibridoma se cribarán en un ELISA para la reactividad contra TAT. La determinación de células de hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales anti-TAT deseados están dentro de la capacidad en la técnica.

[0381] Las células de hibridoma positivo se pueden inyectar por vía intraperitoneal en ratones Balb/c singénicos para producir ascitos que contienen los anticuerpos monoclonales anti-TAT. Alternativamente, las células de hibridoma pueden crecer en frascos de cultivo de tejidos o botellas de rodillo. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en las ascitos puede realizarse utilizando precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede utilizarse la cromatografía de afinidad basada en la unión de anticuerpos a una proteína o proteína G.

[0382] Utilizando la técnica descrita anteriormente, se han generado 11 líneas celulares de hibridoma separadas y distintas, cada una produce anticuerpos monoclonales que se unen al polipéptido TAT10772. Estas 11 líneas celulares de hibridoma se refieren aquí como 16F7.1.15 (que producen el anticuerpo monoclonal 16F7), 17A8.1.3 (que producen el anticuerpo monoclonal 17A8), 9F3.1.3 (que producen el anticuerpo monoclonal 9F3), 16E12.2.15 (que producen el anticuerpo monoclonal 16E12), 16A7.1.3 (que producen el anticuerpo monoclonal 16A7), 10G11.1.1 (que producen el anticuerpo monoclonal 10G11), sub10 (que producen el anticuerpo monoclonal 5B10), 11D10.1.14 (que producen el anticuerpo monoclonal 11D10), 5F6.1.24 (que producen el anticuerpo monoclonal 5F6), 7G6.2.6 (que producen el anticuerpo monoclonal 7G6), y 3A5.3 (que producen el anticuerpo monoclonal 3A5.3). Se ha observado que los anticuerpos monoclonales producidos por estas 11 líneas de hibridoma se unen al polipéptido TAT10772 utilizando técnicas bien conocidas y utilizadas habitualmente, tales como transferencia Western, análisis ELISA, análisis de clasificación FACS de células que expresan el polipéptido TAT10772 y/o análisis por inmunohistoquímica. De las 11 líneas de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales anti-TAT10772 funcionales, dos (clones de hibridoma 11D10.1.14 y 3A5.3) se han depositado bajo los términos del Tratado de Budapest con la American Tissue Type Collection, Manassas, VA tal como se describe en detalle a continuación.

EJEMPLO 6: Análisis de unión competitiva y localización de epítomos

[0383] Los epítomos TAT10772 unidos por los anticuerpos monoclonales descritos se determinaron mediante un análisis de unión competitiva estándar (Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558 (1990)). Los estudios de bloqueo por cruzamiento se realizaron en los anticuerpos mediante fluorescencia directa sobre células PC3 intactas diseñadas para expresar TAT10772 utilizando la Máquina de Cribado PANDEX™ para cuantificar la fluorescencia. Cada anticuerpo monoclonal se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (FITC) utilizando procedimientos establecidos (Wofsy et al., Selected Methods in Cellular Immunology, p. 287, Mishel y Schiigi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)). Las monocapas confluentes de células PC3 que expresan TAT10772 se tripsinizaron, se lavaron una vez, y se resuspendieron a $1,75 \times 10^6$ células/ml en PBS frío que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5% y NaN_3 al 0,1%. Se añadió una concentración final de partículas de látex al 1% (IDC, Portland, OR) para reducir la obturación de las membranas de las placas PANDEX™. Se añadieron a los pocillos de placas PANDEX™ células en suspensión, 20 μl , y 20 μl de anticuerpos monoclonales purificados (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaron sobre hielo durante 30 minutos. Se añadió a cada pocillo una dilución predeterminada de anticuerpos monoclonales marcados con FITC en 20 μl , se incubaron durante 30 minutos, se lavaron, y se cuantificó la fluorescencia mediante la Máquina de PANDEX™. Se consideró que los anticuerpos monoclonales compartían un epítopo si cada uno bloqueaba la unión del otro en 40% o más en comparación con un anticuerpo monoclonal irrelevante control y en la misma concentración de anticuerpo. En este experimento, los anticuerpos monoclonales 16F7, 17A8, 9F3, 16E12, 16A7, 10G11, 5B10, 11D10, 5F6, 7G6, y 3A5 se asignaron a los péptidos de TAT10772 B, B, B, B, B, A, B, B, C, y D, respectivamente. Utilizando este ensayo, un experto en la materia puede identificar otros anticuerpos monoclonales que se unen al mismo epítopo que los descritos anteriormente.

[0384] También se realizó un análisis por delección para identificar la localización aproximada en la secuencia de

polipéptido mostrada como SEC ID NO:2 de los epítomos antigénicos descritos anteriormente. Estos análisis demostraron que el epítomo A antigénico de TAT10772 se halla entre los aminoácidos 6471-6560 de SEC ID NO:2, el epítomo B antigénico de TAT10772 se halla entre los aminoácidos 6389-6470 de SEC ID NO:2, epítomo C antigénico de TAT10772 se halla entre los aminoácidos 6663-6806 de SEC ID NO:2, y el epítomo D antigénico de TAT10772 se halla entre los aminoácidos 3765-6397 de SEC ID NO:2 (que comprende aproximadamente diecisiete secuencias de repetición similares a mucina de 150 aminoácidos y, por lo tanto, muy probablemente comprende múltiples sitios de epítomos antigénicos similares). Los polipéptidos que comprenden cualquiera de estos sitios de epítomos antigénicos identificados específicamente (y moléculas de ácido nucleico que codifican estos polipéptidos) están comprendidos en la presente invención.

[0385] En un experimento separado, se demostró que la unión del anticuerpo monoclonal 3A5 a células OVCAR-3, OVCA-432 y SK-OV-3 determinada mediante análisis de citometría de flujo estándar es análoga al nivel de expresión de ARNm de TAT10772 expresado en cada una de estas tres líneas celulares específicas determinado mediante análisis por PCR cuantitativa estándar. Más específicamente, tal como se determina mediante análisis de PCR cuantitativa estándar, las células OVCAR-3, OVCA-432 y SK-OV-3 expresan un nivel elevado, moderado y bajo de ARNm de TAT10772, respectivamente. Cuando el anticuerpo monoclonal 3A5 se utilizó en análisis de citometría de flujo estándar para cuantificar la capacidad de 3A5 de unirse a estas células, se observó que la unión de 3A5 es cuantitativamente análoga a la cantidad relativa de ARNm de TAT10772 presente en estas líneas celulares. Estos datos sugieren que la cantidad de ARNm de TAT10772 en cualquier tipo de célula particular es determinativo cuantitativamente de la cantidad de polipéptido TAT10772 expresado por ese tipo de célula y, a su vez, es determinativo de la capacidad de cualquier anticuerpo anti-TAT10772 específico de unirse a ese tipo de célula.

EJEMPLO 7: Análisis por inmunohistoquímica

[0386] Se prepararon anticuerpos contra TAT10772 tal como se ha descrito anteriormente y se realizó un análisis por inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos monoclonales 3A5 y 11D10 tal como se indica a continuación. En primer lugar, se fijaron las secciones de tejido durante 5 minutos en acetona/etanol (congeladas o bañadas en parafina). A continuación, las secciones se lavaron en PBS y a continuación se bloquearon con avidina y biotina (kit Vector) durante 10 minutos cada vez seguido de lavado en PBS. A continuación, las secciones se bloquearon con suero al 10% durante 20 minutos y, a continuación se transfirieron para eliminar el exceso. A continuación, se añadió un anticuerpo primario a las secciones a una concentración de 10 µg/ml durante 1 hora y, a continuación, las secciones se lavaron en PBS. A continuación, se añadió un anticuerpo secundario biotinilado (anti-anticuerpo primario) a las secciones durante 30 minutos y a continuación se lavaron las secciones con PBS. A continuación, las secciones se expusieron a los reactivos del kit Vector ABC durante 30 minutos y, a continuación, las secciones se lavaron en PBS. A continuación, las secciones se expusieron a diaminobencidina (Pierce) durante 5 minutos y a continuación se lavaron en PBS. A continuación, las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Mayer, se cubrieron con un portaobjetos y se visualizaron. El análisis por inmunohistoquímica también se puede realizar tal como se describe en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 y Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997).

[0387] Los resultados de estos análisis demuestran que el anticuerpo monoclonal 11D10 no se une para su detección a ninguno de los siguientes tejidos humanos normales: aorta, cerebro, colon, hígado, riñón, intestino delgado, estómago, pulmón (tanto tejido alveolar como bronquial), testículos, bazo, tiroides, ovario, útero, urotelio y placenta. Sin embargo, 6 de 13 muestras independientes de adenocarcinoma de ovario humano y 1 de 7 muestras independientes de adenocarcinoma de endometrio humano muestra una fuerte unión al anticuerpo 11D10. Además, en un experimento separado, el anticuerpo 11D10 se une fuertemente a 1 de 9 muestras de tumor de adenocarcinoma mucino humano, 13 de 22 muestras de tumor de adenocarcinoma de endometrio humano, 17 de 26 muestras de tumor de cistoadenocarcinoma seroso humano y 3 de 8 muestras de tumor de células claras humano.

[0388] Además, los resultados de estos análisis demuestran que el anticuerpo monoclonal 3A5, como el anticuerpo monoclonal 11D10, no se unen para su detección a cualquiera de los tejidos humanos normales indicados anteriormente. Sin embargo, el anticuerpo 3A5 se une fuertemente a 2 de 2 adenocarcinomas de ovario humano independientes (tinción membranosa), 16 de 20 muestras de tumor de adenocarcinoma de endometrio humano, 24 de 25 muestras de tumores de cistoadenocarcinoma seroso humano y 5 de 10 de muestras de células claras humanas.

EJEMPLO 8: El anticuerpo monoclonal 3A5 se internaliza tras la unión a polipéptido TAT10772 en las células

[0389] Este experimento demuestra que el anticuerpo monoclonal 3A5 se internaliza en las células a las que se une el polipéptido TAT10772 en la superficie celular. Específicamente, se incubaron células OVCAR-3 durante 18 horas con el anticuerpo monoclonal 3A5 y dextrano fluorescente y a continuación se detectó cuantitativamente el 3A5 asociado a la célula con un anticuerpo anti-3A5 marcado con fluoresceína. Estos análisis demostraron que el anticuerpo 3A5 se colocaliza con dextrano, indicando que el tráfico del anticuerpo 3A5 en componentes de las células incubadas, incluyendo compartimentos lisosomales de estas células.

EJEMPLO 9: Humanización de anticuerpos monoclonales humanos

[0390] Este ejemplo demuestra la aplicabilidad del método de reparación de CDDR para la humanización de anticuerpos murinos 11D10 y 3A5 dirigidos contra TAT10772.

[0391] Se utilizaron tres formas de TAT10772 durante el proceso de humanización. El antígeno extendido de TAT10772 humano, CA125, comprende el antígeno extendido completo y se adquirió de la US Biological C0050-10. El tallo ("stalk") de TAT10772 consiste en el último dominio de mucina mayormente C-terminal y la siguiente secuencia C-terminal que conduce a la región transmembrana prevista (aminoácidos 6282-6979 de SEC ID NO:2). El TAT10772 de 5 dominios (aminoácidos 4471-5171 de SEC ID NO:2) es una parte recombinante del dominio extracelular que codifica 5 dominios de mucina más la secuencia C-terminal que conduce a la región transmembrana prevista. El tallo de MUC16 y los 5 dominios de mucina se expresaron en células CHO y se purificaron mediante medios convencionales.

[0392] Los números de residuos según Kabat (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Se utilizan las abreviaturas de aminoácido de letra única. Las degeneraciones de ADN se representan utilizando el código IUB (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T). La clonación de dominios variables de 11D10 y 3A5 murinos y la generación de anticuerpos quiméricos de 11D10 y 3A5.

[0393] El ARN total se extrajo de las células de hibridoma que producían 11D10 o 3A5 utilizando métodos estándar. Los dominios de cadena ligera variable (VL) y de cadena pesada variable (VH) se amplificaron utilizando RT-PCR con cebadores degenerados para las cadenas pesada y ligera. Los cebadores directos eran específicos para la secuencia de aminoácidos N-terminal de las regiones VL y VH. Respectivamente, se diseñaron los cebadores inversos LC y HC para hibridarse a una región en la cadena ligera constante (CL) y el dominio 1 de la cadena pesada constante, que están altamente conservadas entre especies. Las regiones VL y VH amplificadas se clonaron en vectores de expresión de mamífero. La secuencia de polinucleótidos de los insertos se determinó utilizando métodos de secuenciación de rutina. Las secuencias de aminoácidos de VL de 11D10 (mu11D10-L) y de VH de 11D10 (mu11D10-H) se muestran en las figuras 3 y 4, respectivamente (SEC ID NOS: 4 y 7, respectivamente); las secuencias de aminoácidos de 3A5 VL (mu3A5-L) y VH (mu3A5-H) se muestran en las figuras 5 y 6, respectivamente (SEC ID NOS: 9 y 11, respectivamente). Las regiones HVR según la numeración de Kabat se muestran en **negrita** en las figuras 3-6.

Injertos directos en la región hipervariable en el armazón de consenso humano aceptor

[0394] El fagémido utilizado para este trabajo es un vector de expresión Fab-g3 monovalente que consiste en 2 marcos de lectura abiertos bajo el control del promotor phoA. El primer marco de lectura abierto consiste en la secuencia señal stII fusionada a los dominios VL y CH1 de la cadena ligera aceptor y el segundo consiste en la secuencia señal stII fusionada a los dominios VL y CH1 de la cadena pesada aceptor seguidos de una proteína P3 de recubrimiento del fago menor.

[0395] Se alinearon los dominios VL y VH de los anticuerpos 11D10 y 3A5 murino con las secuencia consenso kappa I de VL humano (huKI; SEC ID No. 3) y subgrupo III de VH humano (huI; SEC ID No. 6). Para fabricar los injertos HVR, se injertaron regiones hipervariables de los anticuerpos murinos en los armazones aceptores huKI y huI. Para 3A5, se probaron dos armazones VH aceptores (designados aquí como 3A5.L y 3A5.F, respectivamente) que diferían sólo en la posición de aminoácido 78 (véase las figuras 6A-B).

[0396] Las regiones hipervariables de los anticuerpos 11D10 y 3A5 murinos se diseñaron en el armazón de consenso humano aceptor para generar los injertos HVR directos, injerto-11D10, injerto-3A5.L e injerto-3A5.F. En el dominio VL se injertaron las siguientes regiones al aceptor consenso humano: posiciones 24-34 (HVR-L1), 49-56 (HVR-L2) y 89-97 (HVR-L3). En el dominio VH, las posiciones 26-35A (HVR-H1), 49-65 (HVR-H2) y 93-102 (HVR-H3) se injertaron (Figuras 3 a 6). MacCallum et al. (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)) han analizado las estructuras cristalina complejas de anticuerpo y antígeno y hallaron que la posición 49 de la cadena ligera y las posiciones 49, 93 y 94 de la cadena pesada son parte de la región de contacto, por tanto parece razonable incluir estas posiciones en la definición de HVR-L2, HVR-H2 y HVR-H3 cuando se humanizan anticuerpos.

[0397] Se generaron variantes de injerto directo mediante mutagénesis de Kunkel utilizando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Se valoraron los clones correctos mediante la secuenciación de ADN.

Aleatorización de las regiones hipervariables

[0398] Para cada anticuerpo injertado, se introdujo la diversidad de secuencia por separado en cada región hipervariable utilizando una estrategia de aleatorización suave (bibliotecas SR) que mantiene una tendencia hacia la secuencia de región hipervariable murina. Esto se consiguió utilizando una estrategia de síntesis de oligonucleótidos envenenada descritas por primera vez por Gallop et al., J. Med. Chem. 37:1233-1251 (1994). Para una posición determinada en una región hipervariable a mutar, el codón que codifica el aminoácido de tipo salvaje se envenena con una mezcla 70-10-10-10 de nucleótidos que dan lugar a una tasa de mutación promedio del 50 por ciento en cada posición.

[0399] Los oligonucleótidos de aleatorización suave se formaron después de las secuencias de región hipervariable murinas y comprendían las mismas regiones definidas por los injertos directos de la región hipervariable. La posición de aminoácidos al inicio de H2 (posición 49) en el dominio VH se limitó en la diversidad de secuencia a A, G, S o T utilizando el codón RGC.

- 5 **[0400]** Además de las bibliotecas de aleatorización suave indicadas anteriormente, cada posición en cada región hipervariable del injerto-3A5.L el injerto-3A5.F se aleatorizó totalmente en todos los posibles 20 aminoácidos utilizando oligonucleótidos que codifican NNS. Esto se realizó en 2 tipos de bibliotecas. En la primera, se realizaron múltiples bibliotecas consistiendo cada una en 20 elementos que tenían una posición única situada en una de las regiones hipervariables de 3A5 totalmente aleatorizado. Para cubrir cada posición en las regiones hipervariables, se generaron 63 bibliotecas de este tipo y se combinaron en una "biblioteca de posiciones únicas" (biblioteca SP) agrupada que comprende mutaciones individuales localizadas a lo largo de la posición hipervariable. La segunda biblioteca introdujo los 20 aminoácidos en todas las posiciones (biblioteca FR) en una única región hipervariable al mismo tiempo. Para estos tipos de biblioteca, hubo 6 bibliotecas que comprendían cada una una región hipervariable separada del injerto-3A5.L o el injerto-3A5.F.
- 10
- 15 **[0401]** Para evitar la reelección de la secuencia injertada en la CDR de tipo salvaje, se introdujo un codón de detención (TAA) en el centro de cada HVR mediante mutagénesis Kunkel dando lugar a 6 plantillas diferentes para cada injerto (injerto-11D10, injerto-3A5.L e injerto-3A5.F), cada uno con codón de detención introducido en una HVR diferente. Cuando se generan las bibliotecas SR, FR y SP, se utilizaron los oligonucleótidos aleatorizados para introducir diversidad, así como para reparar el codón de detención en la correspondiente plantilla. Para las bibliotecas 3A5, se utilizó una mezcla de plantillas de 3A5.L y 3A5.F durante la construcción de cada biblioteca. Se generaron los 3 tipos de bibliotecas para la humanización de 3AA5, mientras que sólo se generó la biblioteca de SR para la humanización de 11D10.
- 20

Generación de bibliotecas de fagos

- 25 **[0402]** Se fosforilaron por separado grupos de oligonucleótidos aleatorios diseñados para introducir diversidad en cada región hipervariable tal como se ha indicado anteriormente, en reacciones de 20 µl que contenían 660 ng de oligonucleótido, Tris 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 20 mM, y 5 U de polinucleótido quinasa durante 1 hora a 37°C.

- 30 **[0403]** Para generar las bibliotecas de SR y FR cada grupo de oligonucleótidos fosforilado dirigido para introducir diversidad en un HVR único se combinó con 20 µg de plantilla Kunkel que contenía el correspondiente codón de detención. La reacción se realizó en Tris 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM en un volumen final de 500 µl dando lugar a una proporción de oligonucleótido con respecto a la plantilla de 3. Se hibridó la mezcla a 90°C durante 4 min, 50°C durante 5 min y a continuación se enfrió en hielo. A continuación, se llenó la plantilla hibridada (250 µl) mediante la adición de 1 µl de ATP 100mM, 10 µl de dNTPs 25mM (25 mM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 15 µl de DTT 100mM, 25 µl de 10X tampón TM (Tris 0,5 M pH 7,5, MgCl₂ 0,1 M), 2400 U de T4 ligasa, y 30 U de T7 polimerasa durante 3 h a temperatura ambiente. A continuación, se purificó el producto rellenado y se electroporó en células SS320 y se propagó en presencia de fago auxiliar M13/KO7 tal y como describen Sidhu et al., Methods in Enzymology 328:333-363 (2000). Los tamaños de biblioteca variaban de 1 - 2 x 10⁹ clones independientes. Se secuenciaron clones aleatorios a partir de las bibliotecas iniciales para valorar la calidad de las bibliotecas.
- 35

- 40 **[0404]** Se realizaron múltiples reacciones (63) de mutagénesis Kunkel estándar en una placa PCR de 96 pocillos para generar las bibliotecas SP de 3A5. De las reacciones de oligonucleótidos fosforilados (anteriores), se añadieron 2 µl a 300 ng de plantilla de Kunkel que contenía el correspondiente codón de detención en Tris 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM en un volumen final de 10 µl. La mezcla se hibridó a 90°C durante 2 min, 50°C durante 5 min y a continuación se enfrió en hielo. A continuación, la plantilla hibridada se rellenó mediante la adición de 0,5 µl de ATP 10 mM, 0,5 µl de dNTPs 10 mM (10 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de DTT 100 mM, 1 µl de 10X tampón TM (Tris 0,5 M pH 7,5, MgCl₂ 0,1 M), 80 U de T4 ligasa, y 4 U de T7 polimerasa en un volumen total de 20 µl
- 45

durante 2 h a temperatura ambiente. Estos productos rellenos y ligados se transformaron cada uno a continuación en células XL1-azul, se desarrollaron en 0,5 ml de 2Y5 que contenía 5 µg/ml de tetraciclina y fago auxiliar M13/KO7 (MOI 10) durante 2 horas a 37°C y a continuación se agruparon y transfirieron a 500 ml de 2YT que contenía 50 µg/ml de carbenicilina y se desarrollaron durante 16 horas a 37°C.

- 50 *Selección de fagos*

- [0405]** Para las selecciones de fagos indicada a continuación, se inmovilizaron el tallo de TAT10772 (2 µg/ml), CA125 (17 µg/ml), TAT10772 de 5 dominios (2 µg/ml) o neutravidina (2 µg/ml) en PBS en placas de microtitulación MaxiSorp (Nunc) durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon durante por lo menos 1 hora con bloqueador de caseína (Pierce). Los fagos se recogieron del sobrenadante de cultivo y se suspendieron en PBS que contenía BSA al 1% y Tween 20 al 0,05% (PBSBT). Después de la selección de fagos, tal como se indica a continuación, los pocillos de microtitulación se lavaron ampliamente con PBS que contenía Tween20 (PBST) al 0,05% y los fagos unidos se eluyeron mediante la incubación de los pocillos con HCl 100 mM durante 30 minutos. Los fagos se neutralizaron con Tris 1 M, pH 8 y se amplificaron utilizando células XL1-blue y fago auxiliar M13/KO7 y se dejaron
- 55

crecer toda la noche a 37°C en 2YT, carbenacilina 50 µg/ml. Se compararon los títulos de los fagos eluidos de un pocillo que contenía la diana con los títulos de fagos recuperados de un pocillo que no contenía diana para valorar el enriquecimiento.

- 5 **[0406]** Se ha descrito el método de clasificación en solución (Fuh et al. J. Mol. Biol. (2004)) y permite la selección de velocidades “on” más rápidas a través del control de la concentración de diana biotinilada y velocidades “off” más lentas resultantes de la competición con diana no marcada. Se biotinilaron el tallo de TAT10772 y TAT10775 de 5 dominios utilizando Sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce).

- 10 **[0407]** El tallo de TAT10772 se utilizó como fago diana para la humanización de 11D10. El tallo de TAT10772 se inmovilizó directamente en placas de microtitulación MaxiSorp (Nunc) a 2 µg/ml en PBS para la primera ronda de selección de fagos. Las rondas sucesivas de selección utilizaron un método de selección soluble (Fuh et al. J. Mol. Biol. (2004)). El tallo de TAT10772 biotinilado se incubó primero con la biblioteca de fagos durante 1 hora, seguido de una captura de 5 minutos del fago unido en una placa recubierta de neutravidina. Se añadió tallo de TAT10772 no marcado en exceso (más de 100 nM) antes de la etapa de captura para incrementar los periodos de tiempo para aumentar la astringencia de selección. La siguiente tabla resume las condiciones que se utilizaron para el cribado en solución de las bibliotecas de 11D10.

Ronda de selección	[Tallo de TAT10772 biotinilado]	Incubación con exceso de tallo de TAT10772
2	10 nM	20 min a 25°C
3	10 nM	6,5 h a 25°C
4	10 nM	88,5 h a 25°C
5	1 nM	48 h a 25°C, entonces 52 h a 37°C

- 20 **[0408]** Se utilizaron CA125 y TAT10772 de 5 dominios como dianas de fagos para la humanización de 3A5. Se clasificaron las bibliotecas individualmente para la primera ronda de selección contra TAT10772 de 5 dominios inmovilizado (2 µg/ml en PBS) o CA125 (17 µg/ml en PBS) que recubrieron placas de microtitulación Nunc MaxiSorp. Después de la amplificación, se agruparon las bibliotecas según su tipo de biblioteca (FR/SR/SP) y se cribaron frente a CA125 o TAT10772 de 5 dominios y se clasificaron para 2 rondas adicionales frente a sus respectivas dianas inmovilizadas. Se realizaron tres rondas sucesivas de selección mediante cribado continuo frente a las dianas inmovilizadas o mediante selección frente a TAT10772 de 5 dominio biotinilado soluble utilizando una estrategia de clasificación en solución (Fuh et al. J. Mol. Biol. (2004)). Para el método de clasificación en solución, se incubaron bibliotecas con TAT10772 de 5 dominios biotinilado 1 nM durante 1 hora seguido de la adición de un exceso de TAT10772 de 5 dominios no marcado (mayor de 100 nM) durante hasta 22 horas para incrementar la astringencia de selección. Se capturaron brevemente (5 min) los fagos unidos a TAT10772 de 5 dominios biotinilado utilizando una placa recubierta de neutravidina.

ELISA de fagos de tallo de TAT10772

- 30 **[0409]** Se recubrieron placas de microtitulación MaxiSorp con tallo de TAT10772-stalk a 2 µg/ml en PBS durante la noche y a continuación se bloquearon con Bloqueador de Caseína. Se incubaron los fagos de los sobrenadantes de cultivo con tallo de TAT10772 diluido en serie en PBST que contenía BSA al 1% en una placa de microtitulación de cultivo de tejido durante 1 hora, después de lo cual se transfirieron 80 µl de la mezcla a los pocillos recubiertos diana durante 15 minutos para capturar el fago no unido. La placa se lavó con PBST y se añadió anti-M13 conjugado a HRP (Amersham Pharmacia Biotech) (1:5000 en PBSBT) durante 40 min. La placa se lavó con PBST y se reveló añadiendo sustrato de tetrametilbenzidina (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Se representó la absorbancia a 450 nm en función de la concentración de la diana en solución para determinar una IC₅₀. Esta se utilizó como una estimación de la afinidad para el clon de Fab expresado en la superficie del fago.

Producción de Fab e IgG y determinación de la afinidad

- 40 **[0410]** Para expresar la proteína Fab para las mediciones de afinidad, se introdujo un codón de detención entre la cadena pesada y g3 en el vector de expresión de fago. Los clones se transformaron en células 34B8 de *E. Coli* y se desarrollaron en medio C.R.A.P. completo a 30°C (Presta et al. Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)). Las células se recogieron por centrifugación, se suspendieron en PBS, PMSF 100 µM, benzamidina 100 µM, EDTA 2,5 mM y se rompieron abiertas utilizando un microfluidizador. Se purificó Fab con cromatografía de afinidad de proteína G.
- 45 **[0411]** Las determinaciones de afinidad se realizaron mediante resonancia de plasmón superficial utilizando un BIAcoreTM-2000. Se inmovilizaron 500 RU de TAT10772 de 5 dominios o 300 RU de IgG en acetato de sodio 10 mM pH 4,8 en un chip sensor CM5 y se inyectaron diluciones de 2 veces en serie del correspondiente compañero de unión (1 -1000nM) en PBST a una velocidad de flujo de 20 µl/min. Cada muestra se analizó con una asociación de 5

minutos y una disociación de 10 minutos. Después de cada inyección el chip se regeneró utilizando glicina 10 mM pH 1,5. La respuesta de unión se corrigió restando RU de una célula de flujo en blanco. Para el análisis cinético se utilizó un modelo Langmuir 1:1 de ajuste simultáneo de k_{on} y k_{off} .

Humanización de 11D10

- 5 **[0412]** El armazón aceptor humano utilizado para la humanización de 11D10 consiste en el dominio de VL kappa I consenso humano y una variante del dominio VH consenso subgrupo III humano. Los dominios VL y VH de 11D10 murino se alinearon cada uno con los dominios kappa I y subgrupo III humanos; se identificó cada región determinante de complementariedad (CDR) y se injertó en el armazón aceptor humano para generar un injerto HVR que se pudiera expresar como un Fab en un fago (figuras 3 y 4). Cuando se analizó el fago que expresaba el injerto para la unión a CA125 inmovilizado, se observó la unión del fago. Cuando se expresó la secuencia de injerto de HVR de 11D10 como un Fab, el análisis Biacore también puso de manifiesto la unión a CA125.

- 10 **[0413]** Se generó una biblioteca de SR para 11D10 en que cada HVR se aleatorizó individualmente de forma suave. Las 6 bibliotecas de SR se cribaron cada una por separado contra el tallo de TAT10772 inmovilizado durante 5 rondas de selección. Se observó enriquecimiento empezando después de la ronda 3 y después de la ronda 5, se eligieron los clones para análisis de secuencia de ADN. Se observaron los cambios de secuencia que reconocen cada una de las HVR. Se cribaron los clones utilizando ELISA de fagos anti-TAT10772. Se expresaron los clones de selección como Fab para un análisis posterior mediante Biacore. Se reformatearon varios clones como IgG para análisis Scatchard. El análisis FACS utilizando células OVCAR-3 demostró que todos los anticuerpos humanizados 11D10 analizados eran capaces de clasificar dichas células por FACS de manera eficaz. A partir de estos resultados está claro que existen múltiples cambios en las secuencias que pueden reparar la afinidad de 11D10 injertado en un armazón humano y que este anticuerpo se puede humanizar mediante la reparación de CDR para generar afinidades que cumplen o superan la del anticuerpo murino inicial.

Humanización de 3A5

- 25 **[0414]** Se utilizaron dos armazones aceptores humanos, 3A5.L y 3A5.F, para la humanización de 3A5 y se basan en el dominio de VL de consenso kappa I humano y el dominio de VH de consenso del subgrupo III humano. Los dominios de VL y VH de 3A5 murino se alinearon cada uno con los dominios kappa I y subgrupo III humanos; se identificó cada región determinante de complementariedad (CDR) y se injertó en el armazón aceptor humano para generar un injerto de HVR que se podía expresar como un Fab en fago (figuras 5 y 6). Cuando se analizaron los fagos que expresaban los injertos HVR de 3A5 para la unión a CA125 inmovilizado, se observó la unión a fago PATRA ambos. Cuando se expresó como un Fab, el análisis de Biacore también evidenció la unión de ambos a TAT10772 de 5 dominios.

- 30 **[0415]** Se generaron bibliotecas de SR, FR y SP en que se introdujo diversidad por separado en cada HVR del injerto de HVR de 3A5. Las bibliotecas se cribaron contra CA125 y TAT10772 de 5 dominios utilizando las estrategias de fase sólida y clasificación en solución. El método de clasificación en solución permite seleccionar clones de alta afinidad a través de la manipulación de la concentración de la diana biotinilada y el tiempo de captura del fago, mientras que la adición de diana no marcada se puede utilizar para eliminar clones con velocidades "off" más rápidas (Fuh et al. J. Mol. Biol. 340, 1073-1093 (2004)). El enriquecimiento se observó después de la segunda ronda en todas las bibliotecas. El análisis FACS utilizando células OVCAR-3 demostró que todos los anticuerpos humanizados 3A5 analizados eran capaces de clasificar dichas células por FACS de manera efectiva.

- 40 **[0416]** Después de la ronda 5, se recogieron los clones para el análisis de secuencia de ADN de cada biblioteca y se revelaron cambios en la secuencia dirigidas a HVR-H3, lo que sugería que el rediseño de esta CDR era importante para la restauración de la unión a antígeno.

Análisis de secuencia de clones humanizados

- 45 **[0417]** Se obtuvieron las secuencias de aminoácidos para todas las regiones HVR de cadena ligera y cadena pesada de todos los clones humanizados. Para anticuerpos 11D10 humanizados, las secuencias de HVR obtenidas se muestran en las figuras 7-12. Para anticuerpos 3A5 humanizados, las secuencias de HVR obtenidas se muestran en las figuras 13-18. Las figuras 19 y 20 muestran secuencias armazón de consenso humanas aceptoras de ejemplo para cadenas pesada variable y ligera variable, respectivamente. La presente invención comprende anticuerpos que comprenden por lo menos una de las secuencias armazón de consenso humanas aceptoras en combinación con por lo menos una de las secuencias de HVR descritas.

Análisis de unión para clones de anticuerpo 3A5 humanizados seleccionados

- 55 **[0418]** Se seleccionaron varios clones de 3A5 humanizados para expresar como IgG y se caracterizaron para la unión a TAT10772 por Biacore, un ELISA de unión competitiva y análisis de unión a células OVCAR-3. Los resultados de los análisis ELISA estándar se muestran en la Tabla 7 siguiente. Los resultados de los análisis Biacore estándar que miden la unión de TAT10772 de dominio 5' a anticuerpos IgG variantes de 3A5 inmovilizados se muestran en la tabla 8 siguiente. Cabe indicar que todos los anticuerpos analizados fueron IgG y contenían la secuencia de cadena ligera variable mostrada aquí como SEC ID NO:211. Se observó que una mutación trasera de

S49Y en VL no tenía efecto en la unión y se incorporaba en las variantes humanizadas finales como tirosina que es la forma más habitual en esta posición. La secuencia de cadena pesada variable del anticuerpo se refiere en las tablas 7 y 8. Tal como se muestra en las tablas 7 y 8, varios clones cumplen o superan la afinidad monomérica del anticuerpo quimérico tal como se resume.

Tabla 7

ELISA Kd (nM)

Versión de anticuerpo 3A5 (Secuencia de cadena VH)	CA125	TAT10772 dominio 5'		Células OVCAR-3
Quimera de 3A5 (mu3A5-H; SEC ID NO:11)	0,3	2,3		0,3
injerto-3A5.L (SEC ID NO:12)				7,1
injerto-3A5.F (SEC ID NO:13)	51,4	90,3		0,6
3A5v1 (SEC ID NO:198)	0,6	3,0		0,5
3A5v2 (SEC ID NO:199)	0,8	3,7		0,7
3A5v3 (SEC ID NO:200)	0,5	1,6		0,2
3A5v4 (SEC ID NO:201)	0,3	2,4		0,8
3A5v5 (SEC ID NO:202)	8,2	10,2		0,6
3A5v6 (SEC ID NO:203)	4,4	5,7		0,6
3A5v7 (SEC ID NO:204)	1,2	3,3		0,8
3A5v8 (SEC ID NO:205)	0,4	2,6		0,5

Tabla 8

Versión de anticuerpo 3A5 (Secuencia de cadena VH)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	Kd(nM)
Quimera de 3A5 (mu3A5-H; SEC ID NO:11)	4,48E+04	1,21E-04	2,7
injerto-3A5.F (SEC ID NO:13)	2,85E+04	2,92E-04	10
3A5v1 (SEC ID NO:198)	3,69E+04	1,78E-04	4,8
3A5v2 (SEC ID NO:199)	3,34E+04	1,21E-04	3,6
3A5v3 (SEC ID NO:200)	3,62E+04	1,30E-04	3,6
3A5v8 (SEC ID NO:205)	5,51E+04	1,27E-04	2,3

- 5 **[0419]** También se analizaron varios anticuerpos 3A5 humanizados en un ELISA de unión competitiva (que miden la unión a TAT10772 de dominio 5' y CA125 inmovilizados) y análisis de unión a células OVCAR-3, donde los resultados de estos análisis se muestran en las figuras 23-35. Tal como se muestra en las figuras 23-25, todos los anticuerpos humanizados 3A5 analizados son capaces de unirse intensamente al polipéptido diana TAT10772 y competir de manera eficaz por la unión en sitios antigénicos en ese polipéptido diana.

10 *Eliminación de un sitio de glicosilación en CDR-H2 de variantes de 3A5 humanizadas*

- [0420]** Para evitar potenciales problemas de fabricación, se eliminó un potencial sitio de glicosilación en CDR-H2 de las variantes de 3A5 humanizado utilizando métodos de selección de fagos para identificar los cambios de secuencia adecuados. Por separado, N52 y S54 se dispusieron totalmente al azar utilizando el codón NNS para permitir todas las posibles sustituciones de aminoácidos. Se seleccionaron estas bibliotecas pequeñas de fagos de 20 miembros para la unión a TAT10772 de dominio 5'. Aunque se hallaron N52 y S54, se observaron frecuentemente ciertas

sustituciones en ambas posiciones, siendo los cambios N52S y S54A los más abundantes. Algunos datos de los análisis scatchard estándar se muestran en la siguiente tabla 9, donde los anticuerpos se expresan como IgG que tiene una secuencia de cadena ligera variable mostrada aquí como SEC ID NO:211 y la secuencia de cadena pesada variable mostrada en la tabla 9. Cuando cualquier de los cambios descritos se incorporaba en las variantes humanizadas 3A5.v1 o 3A5.v4 (véase SEC ID NOS:206-209), no afectaban a la afinidad de unión para TAT10772.

Tabla 9

Versión de anticuerpo 3A5 (Secuencia de cadena VH)	Kd (nM)
Quimera de 3A5 (mu3A5-H; SEC ID NO:11)	0,57 ± 0,3
3A5v1b 52 (SEC ID NO:206)	0,47 ± 0,1
3A5v1b 54 (SEC ID NO:207)	0,37 ± 0,4
3A5v4b 52 (SEC ID NO:208)	0,46 ± 0,5

EJEMPLO 10: Preparación de anticuerpos conjugados a toxina que se unen a TAT10772

[0421] La utilización de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), es decir inmunoconjugados, para la liberación local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir fármacos para matar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Payne (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Dug Del. Rev. 26:151-172; US 4,975,278) permite la liberación dirigida del grupo farmacológico a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugado puede dar lugar a niveles inaceptables de toxicidad en las células normales, así como en las células tumorales a eliminar (Baldwin et al., (1986) Lancet (Mar. 15, 1986) pág. 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pág. 475-506). De este modo, se busca la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Los esfuerzos por diseñar y refinar los ADC se han centrado en la selectividad de anticuerpos monoclonales (mAbs), así como las propiedades de unión a fármaco y liberación de fármacos. Tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales se han descrito como útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Los fármacos utilizados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al., (1986) supra). Las toxinas utilizadas en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas, tales como la toxina de la difteria, toxinas de plantas, tales como ricina, toxinas de molécula pequeña, tales como geldanamicina (Mandler et al. (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342).

[0422] En los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención, se conjuga un anticuerpo (Ab) a uno o más grupos farmacológicos (D), por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 grupos farmacológicos por anticuerpo, a través de un enlazador (L). El ADC que tiene la fórmula

Ab-(L-D)_p

se puede preparar mediante varias rutas, utilizando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por un experto en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente para formar Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido de una reacción con un grupo farmacológico D; y (2) reacción de un grupo nucleofílico de un grupo farmacológico con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo. Métodos adicionales para preparar ADC se describen aquí.

[0423] El enlazador puede estar compuesto de uno o más componentes enlazadores. Entre los componentes enlazadores de ejemplo se incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato ("SMCC"), y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). En la técnica se conocen más componentes enlazadores y algunos se describe aquí.

[0424] En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender residuos de aminoácidos. Entre los componentes enlazadores con aminoácidos de ejemplo se incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Entre los dipéptidos de ejemplo se incluyen: valine-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Entre los tripéptidos de ejemplo se incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos de aminoácidos que comprende un componente enlazador con aminoácido incluyen los aminoácidos naturales, así como aminoácidos secundarios y análogos de aminoácidos no naturales, tales como citrulina. Los

componentes enlazadores con aminoácidos se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la división enzimática mediante una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D o una proteasa de plasmina,

[0425] Entre los grupos nucleofílicos en los anticuerpos se incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o grupos amina de azúcares donde el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, hidracina, carboxilato y arilhidrazida son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los fragmentos de enlazador y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos y haluros de acilo; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos presentan puentes disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden volver reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará por tanto, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleofílicos adicionales en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando lugar a la conversión de una amina en tiol. Los grupos tiol reactivos se pueden introducir en el anticuerpo (o fragmento del mismo) mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprende uno o más residuos de aminoácido cisteína no nativos).

[0426] Los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente invención también se pueden producir mediante la modificación del anticuerpo para introducir grupos electrofílicos, los cuales pueden reaccionar con los sustituyentes nucleofílicos en el reactivo enlazador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glicosilados se pueden oxidar, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o grupos farmacológicos. Los grupos imina resultantes de base de Schiff pueden formar una unión estable, o se pueden reducir, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar uniones de amina estables. En una realización, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen los residuos serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-peryodato sódico dando lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Dicho aldehído puede reaccionar con un nucleófilo de grupo farmacológico o enlazador.

[0427] Alternativamente, se puede fabricar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado ya estén adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0428] En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el prerreconocimiento de un tumor, en la que se administra el conjugado anticuerpo-receptor al paciente, seguido de la extracción del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente purificador y, a continuación, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

[0429] Las técnicas específicas para producir conjugados anticuerpo-fármaco mediante la unión de toxinas a anticuerpos purificados son conocidas y se utilizan habitualmente en la técnica. Por ejemplo, la conjugación de un anticuerpo monoclonal purificado a la toxina DM1 se puede realizar de la siguiente manera. El anticuerpo purificado se deriva con N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato para introducir grupos ditiopiridilo. Se trata el anticuerpo (376,0 mg, 8 mg/mL) en 44,7 ml de tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5) que contenía NaCl (50 mM) y EDTA (1 mM) con SPP (5,3 equivalentes molares en 2,3 ml de etanol). Después de la incubación durante 90 minutos bajo argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra en gel a través de una columna Sephadex G25 equilibrada con citrato de sodio 35 mM, NaCl 154 mM y EDTA 2 mM. A continuación, las fracciones que contienen anticuerpos se agrupan y se analizan. Se diluye el anticuerpo-SPP-Py (337,0 mg con grupos 2-tiopiridina liberables) con el tampón de citrato de sodio 35 mM anterior, pH 6,5, hasta una concentración final de 2,5 mg/ml. A continuación, se añade DM1 (1,7 equivalentes, 16,1 moles) en dimetilacetamida 3,0 mM (DMA, 3% v/v en la mezcla de reacción final) a la solución de anticuerpos. La reacción se deja proceder a temperatura ambiente bajo argón durante 20 horas. La reacción se carga en una columna de filtración en gel Sephacryl S300 (5,0 cm x 90,0 cm, 1,77 L) equilibrada con citrato de sodio 35 mM, NaCl 154 mM, pH 6,5. El flujo es de 5,0 ml/min y se recogen 65 fracciones (20,0 ml por cada). Las fracciones se agrupan y se analizan, donde el número de moléculas de fármaco DM1 unidas por molécula de anticuerpos (p') se determina midiendo la absorbancia a 252 nm y 280 nm.

[0430] Para fines ilustrativos, la conjugación de un anticuerpo monoclonal purificado a la toxina Dm2 también se puede realizar de la siguiente manera. El anticuerpo purificado se derivatiza con succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, Pierce Biotechnology, Inc) para introducir el enlazador de SMCC. El anticuerpo se trata a 20 mg/ml en fosfato de potasio 50 mM/cloruro de sodio 50 mM/EDTA 2 mM, pH 6,5 con 7,5 equivalentes

molares de SMCC (20 mM en DMSO, 6,7 mg/ml). Después de la agitación durante 2 horas bajo argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de una columna Sephadex G25 equilibrada con fosfato de potasio 50 mM/cloruro de sodio 50 mM/EDTA 2 mM, pH 6,5. Las fracciones que contienen anticuerpo se agrupan y se analizan. A continuación el anticuerpo-SMCC se diluye con fosfato de potasio 50 mM/cloruro de sodio 50 mM/EDTA 2 mM, pH 6,5 hasta una concentración final de 10 mg/ml y reacciona con una solución 10 mM de DM1 (1,7 equivalentes suponiendo 5 SMCC/anticuerpo, 7,37 mg/ml) en dimetilacetamida. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente bajo argón durante 16,5 horas. La mezcla de reacción de la conjugación a continuación se filtra a través de una columna de filtración en gel Sephadex G25 (1,5 x 4,9 cm) con 1 x PBS a pH 6,5. La proporción DM1/anticuerpo (p) se mide a continuación mediante la absorbancia a 252 nm y a 280 nm.

[0431] Además, se puede modificar una cisteína libre de un anticuerpo por el reactivo bis-maleimido BM(PEO)₄ (Pierce Chemical), dejando un grupo maleimido no reaccionado en la superficie del anticuerpo. Esto se puede realizar disolviendo el BM(PEO)₄ en una mezcla de etanol/agua al 50% hasta una concentración de 10 mM y añadiendo un exceso molar de 10 veces a una solución de que contiene el anticuerpo en solución salina tamponada con fosfato a una concentración de aproximadamente 1,6 mg/ml (10 micromolar) y dejándolo reaccionar durante 1 hora. El exceso de BM(PEO)₄ se elimina mediante filtración en gel en citrato 30 mM, pH 6 con tampón de NaCl 150 mM. Se disuelve un exceso molar de aproximadamente 10 veces de DM1 en dimetilacetamida (DMA) y se añade al intermedio anticuerpo-BMPEO. También se puede utilizar dimetilformamida (DMF) para disolver el reactivo de grupo farmacológico. La mezcla de reacción se deja reaccionar durante la noche antes de la filtración en gel o la diálisis en PBS para extraer el fármaco no reaccionado. La filtración en gel en columnas S200 en PBS se utiliza para eliminar los agregados de peso molecular elevado y proporcionar un conjugado anticuerpo-BMPEO-DM1 purificado.

[0432] Los fármacos citotóxicos se han conjugado habitualmente a anticuerpos a través de los numerosos y frecuentes residuos de lisina del anticuerpo. También se ha realizado la conjugación a través de grupos tiol presentes el anticuerpo de interés o diseñados en el mismo. Por ejemplo, se han introducido residuos de cisteína en proteínas mediante técnicas de modificación genética para formar sitios de unión covalente para ligandos (Better et al. (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; Greenwood et al. (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno et al. (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214; Chmura et al. (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; patente de Estados Unidos No. 6,248,564). Una vez existe una cisteína libre en el anticuerpo de interés, las toxinas se pueden unir a este sitio. Como ejemplo, los reactivos de enlazadores a fármacos, maleimidocaproil-monometil auristatina E (MMAE), es decir MC-MMAE, maleimidocaproil-monometil auristatina F (MMAF), es decir MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE o MC-val-cit-PAB-MMAF, disueltos en DMSO, se diluyen en acetonitrilo y agua a concentraciones conocidas, y se añaden a anticuerpo derivatizado con cisteína enfriado en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para detener la reacción y taponar cualquier grupo tiol de anticuerpo no reaccionado. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga y el anticuerpo conjugado a toxina se purifica y desala mediante elución a través de una resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 m bajo condiciones estériles y se congela para el almacenamiento.

[0433] Adicionalmente, los anticuerpos anti-TAT de la presente invención se pueden conjugar a toxinas de auristatina y dolostatina (tales como MMAE y MMAF) utilizando la siguiente técnica. Se trata el anticuerpo, disuelto en borato de sodio 500 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 8,0, con un exceso de ditiotretol (DTT) 100 mM. Después de la incubación a 37°C durante aproximadamente 30 minutos, se intercambia el tampón mediante elución sobre la resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con DTPA 1 mM. El valor de tiol/Ab se comprueba determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol mediante la reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfría en hielo.

[0434] El reactivo de enlazador a fármaco, (1) maleimidocaproil-monometil auristatina E (MMAE), es decir MC-MMAE, (2) MC-MMAF, (3) MC-val-cit-PAB-MMAE, o (4) MC-val-cit-PAB-MMAF disueltos en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a una concentración conocida, y se añade al anticuerpo reducido enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para detener la reacción y taponar cualquier grupo tiol del anticuerpo no reaccionado. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga y el anticuerpo conjugado se purifica y desala mediante elución a través de una resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 m bajo condiciones estériles y se congela para el almacenamiento.

EJEMPLO 11: Ensayo de citólisis tumoral in vitro

[0435] Se pueden obtener células de mamífero que expresan el polipéptido TAT de interés utilizando un vector de expresión estándar y técnicas de clonación. Alternativamente, están disponibles públicamente muchas líneas celulares tumorales que expresan polipéptidos TAT de interés, por ejemplo, a través de ka ATT y se pueden identificar por rutina utilizando análisis ELISA o FACS estándar. A continuación los anticuerpos monoclonales anti-polipéptido TAT (y derivados de los mismos conjugados a toxina) se pueden utilizar en ensayos para determinar la capacidad del anticuerpo de matar células que expresan el polipéptido TAT in vitro.

[0436] Por ejemplo, las células que expresan el polipéptido TAT de interés se obtienen tal como se ha descrito

anteriormente y se emplacan en placas de 96 pocillos. En un análisis, el conjugado anticuerpo/toxina (o anticuerpo desnudo) se incluye en la incubación celular durante un periodo de 4 días. En un segundo análisis independiente, las células se incuban durante 1 hora con el conjugado anticuerpo/toxina (o anticuerpo desnudo) y a continuación se lavan e incuban en ausencia de conjugado anticuerpo/toxina durante un periodo de 4 días. A continuación, se mide la viabilidad celular utilizando el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo de Promega (Cat# G7571). Las células no tratadas sirven como control negativo.

[0437] En un primer experimento y específico con respecto a la presente invención, se analizaron varias concentraciones de conjugados con MMAF y MMAE de los anticuerpos quiméricos de 3A5 y 11D10 para conocer la capacidad de eliminar (1) la línea celular OVCAR-3 que expresa el polipéptido TAT10772, (2) una línea celular derivada de PC3 modificada para expresar de forma estable el polipéptido TAT10772 en su superficie celular (PC3/A5.3B2) y (3) una línea celular PC3 que no expresa el polipéptido TAT10772 (PC3/neo). Los anticuerpos quiméricos de 3A5 utilizados en estos análisis contenían la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable mostrada aquí como SEC ID NO:211 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable mostrada aquí como SEC ID NO:11. Los anticuerpos quiméricos de 11D10 utilizados en estos análisis contenían la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable mostrada aquí como SEC ID NO:4 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable mostrada aquí como SEC ID NO:7. Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 26-31 y demuestran que cada uno de los anticuerpos conjugados a toxina causaban niveles significativos de muerte celular en las células OVCAR-3 y PC3/A5.3B2 (es decir, células que expresan el polipéptido TAT10772 en la superficie celular), mientras que no se observó una citólisis significativa para ninguno de los anticuerpos en las células PC3/neo (que no expresan el polipéptido TAT10772 en la superficie celular). Estos datos demuestran que los anticuerpos analizados son capaces de unirse al polipéptido TAT10772 en la superficie de células que expresan ese polipéptido y que provocan la muerte de esas células *in vitro*.

EJEMPLO 12: Ensayo de citólisis de tumores *in vivo*

Modelo de tumor intraperitoneal

[0438] Para analizar la eficacia de los anticuerpos quiméricos anti-polipéptido TAT10772 de 11D10 y 3A5 *in vivo*, se inyectaron 2×10^7 células OVCAR-3/luc por ratón 110 SCID en la cavidad peritoneal y se dejaron crecer durante 20 días después de la inyección. En el día 20 después de la inyección, los ratones se segregaron en 9 grupos diferentes de 9-10 ratones por grupo y se determinó el volumen del tumor en cada ratón. En los días 23, 30, 37 y 44 después de la inyección, los ratones se trataron de la siguiente manera:

Grupo A – vehículo solo

Grupo B – 2,5 mg/kg 11D10-MC-vc-PAB-MMAE quimérico

Grupo C – 2,5 mg/kg 11D10-MC-vc-PAB-MMAF quimérico

Grupo D – 2,5 mg/kg 11D10-MC-MMAF quimérico

Grupo E – 2,5 mg/kg 3A5-MC-vc-PAB-MMAE quimérico

Grupo F – 2,5 mg/kg 3A5-MC-vc-PAB-MMAF quimérico

Grupo G – 2,5 mg/kg 3A5-MC-MMAF quimérico

Grupo H – 2,5 mg/kg anti-artemisa-MC-vc-PAB-MMAE

Grupo I – 2,5 mg/kg anti-artemisa-MC-vc-PAB-MMAF

[0439] El volumen del tumor se midió en cada ratón en los días 27, 34, 41, 48, 55 y 69 después de la inyección para determinar la eficacia de cada tratamiento en la reducción del volumen del tumor. Adicionalmente, se determinó diariamente el % de supervivencia de animales a lo largo de 250 días después del tratamiento.

[0440] Los resultados de estos análisis *in vivo* demostraron que los ratones que fueron tratados con vehículo solo (Grupo A) o con el anticuerpo no específico de TAT10772 anti-artemisa (Grupos H e I) no mostraron una reducción observable en el volumen del tumor posteriormente al tratamiento. De hecho, los tumores en estos animales continua simplemente incrementando de tamaño con el tiempo. Estos resultados demuestran que los anticuerpos que son incapaces de unirse al polipéptido TAT10772, incluso si están conjugados a toxina, no proporcionan un efecto terapéutico específico (o incluso no específico). En cambio, la mayoría de animales en los Grupos B-G evidenciaron una reducción significativa y reproducible en el volumen del tumor después del tratamiento, demostrando que ambos 11D10 y 3A5 quiméricos proporcionan un efecto terapéutico *in vivo*. De hecho, muchos de los animales de los Grupos B-G evidenciaron una necrosis tumoral completa. Estos datos demuestran claramente que ambos anticuerpos quiméricos 11D10 y 3A5 proporcionan un efecto terapéutico *in vivo* específico, significativo y reproducible para el tratamiento de tumores que expresan el polipéptido TAT10772.

[0441] Con respecto al porcentaje de supervivencia, todos los animales de los Grupos A, H e I perecieron antes del

día 125 después de la implantación. Sin embargo, en el mismo punto de tiempo, el 90% de los animales del Grupo B, el 80% de los animales de los Grupos E y F y el 55% de los animales de los Grupos C, D y G permanecieron vivos evidenciando que ambos anticuerpos quiméricos 11D10 y 3A5 proporcionan un efecto terapéutico *in vivo* específico, significativo y reproducible para el tratamiento de tumores que expresan el polipéptido TAT10772. Los resultados de un modelo de riesgo proporcional Cox se muestra en la tabla 10 siguiente, donde se determinó el índice de riesgo (H.R.) para cada uno de los ocho subgrupos que no eran vehículos (al Grupo A con sólo vehículo se le asignó un índice de riesgo de 1,0).

Tabla 10

Grupo	log H.R.	S.E. de log H.R.	H.R.	95% de intervalo de confianza para H.R.
B	-2,86	0,55	0,057	(0,019, 0,168)
C	-2,22	0,52	0,108	(0,039, 0,300)
D	-1,40	0,48	0,248	(0,096, 0,635)
E	-4,51	0,71	0,011	(0,0027, 0,044)
F	-5,21	0,87	0,006	(0,001,0,030)
G	-3,12	0,59	0,044	(0,013,0,140)

10 *Modelo de inyección subcutánea, modelo de transplante de almohadillas adiposas mamarias y modelos de transplante de xenoinjertos*

[0442] Los resultados de experimentos *in vivo* adicionales que miden la eficacia terapéutica de anticuerpos quiméricos 3A5 se muestran en las figuras 32-37. Más específicamente, se analizaron los anticuerpos 3A5 quiméricos conjugados a toxina por su capacidad para disminuir el tamaño de tumor *in vivo* en un conjunto de diferentes formatos *in vivo* incluyendo, formación de tumores por inyección subcutánea de células PC3/C5.3B2 seguido de varios tratamientos con anticuerpos (Figura 32), transplante de células OVCAR-3 en la almohadilla adiposa mamaria de ratones SCID beige seguido de varios tratamientos con anticuerpos (figuras 33-35 y 37) y transplante de xenoinjertos de 10 millones de células PC3/A5.3B2 por ratón desnudo seguido de varios tratamientos con anticuerpos (figura 36). Los resultados de estos experimentos muestran que los diversos anticuerpos anti-TAT10772 son eficaces en el tratamiento terapéutico de tumores que expresan TAT10772 *in vivo*.

EJEMPLO 13: Utilización de TAT como sonda de hibridación

[0443] El siguiente procedimiento describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica TAT como sonda de hibridación para, por ejemplo, el diagnóstico de la presencia de un tumor en un mamífero.

[0444] El ADN que comprende la secuencia codificante del TAT de longitud completa o maduro tal como se describe aquí, también se puede utilizar como sonda para cribar los ADNs homólogos (tales como aquéllos que codifican variantes naturales de TAT) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano.

[0445] La hibridación y el lavado de filtros que contienen cualquier ADN de biblioteca se realizan según las siguientes condiciones de elevada astringencia. La hibridación de la sonda derivada de TAT radiomarcada a los filtros se realiza en una solución al 50% de formamida, 5x SSC, SDS al 0,1%, pirofosfato de sodio al 0,1%, 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,8, 2x de solución de Denhardt, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de 0,1x SSC y SDS al 0,1% a 42°C.

[0446] A continuación, se pueden identificar los ADNs que tienen una identidad secuencial deseada con el ADN que codifica TAT de secuencia nativa y longitud completa utilizando las técnicas estándar conocidas en el sector.

EJEMPLO 14: Expresión de polipéptido de TAT en *E.coli*

[0447] Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de TAT mediante la expresión recombinante en *E. Coli*.

[0448] La secuencia de ADN que codifica TAT se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios para las enzimas de restricción que se correspondan con los sitios para enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de vector adecuado es el pBR322 (derivado del *E. Coli*, véase Bolivar et.al., *Gene*, 2:95 (1977)) que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector se digiere con una enzima de restricción y se desfosforila. A continuación, las secuencias amplificadas por PCR se unen en el vector. El vector

preferiblemente incluirá secuencias que codifican un gen resistente a un antibiótico, un promotor trp, una secuencia líder poli-His (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia poli-His, y sitio de división para la enteroquinasa), la región codificante de TAT, el terminador transcripcional lambda, y un gen argU.

[0449] A continuación, la mezcla de unión se utiliza para transformar una cepa seleccionada de *E. Coli* utilizando los procedimientos descritos en Sambrook et. al., *supra*. Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas de LB y, a continuación, se seleccionan las colonias resistentes a los antibióticos. El ADN plasmídico se puede aislar y confirmar mediante el análisis de restricción y la secuenciación del ADN.

[0450] Los clones seleccionados se pueden desarrollar durante toda la noche en un medio de cultivo líquido tal como el caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo de toda la noche se puede utilizar posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. A continuación, las células se desarrollan hasta una densidad óptica deseada, durante la cual el promotor de la expresión se activa.

[0451] Después de cultivar las células durante muchas más horas, las células se pueden recoger mediante centrifugación. El residuo de células obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y la proteína TAT solubilizada se puede a continuación purificar utilizando una columna quelante de metal en condiciones que permiten la unión fuerte de la proteína.

[0452] El TAT se puede expresar en *E. Coli* en una forma etiquetada con poli-His según el procedimiento siguiente. El ADN que codifica TAT se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios para enzimas de restricción que corresponden con los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio de traducción eficiente y fiable, una purificación rápida en una columna quelante de metales y la eliminación proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias etiquetadas con poli-His amplificadas por PCR se ligan a continuación en un vector de expresión, que se utiliza para transformar un huésped *E. Coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA)lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq). Los transformantes se desarrollan en primer lugar en LB que contiene carbenicilina 50 mg/ml a 30°C con agitación hasta alcanzar una D.O. de 3-5 a 600 nm. Los cultivos se diluyen entonces 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato sódico-2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y se desarrollan durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Se toman muestras para verificar la expresión mediante análisis de SDS-PAGE, y se centrifuga todo el cultivo para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se congelan hasta la purificación y renaturalización.

[0453] La pasta de *E. Coli* de fermentaciones de 0,5-1 l (6-10 g de residuo) se resuspende en 10 volúmenes (p/v) en guanidina 7 M, Tris 20 mM, tampón pH 8. Se añaden sulfito sódico sólido y tetratiónato sódico hasta concentraciones finales de 0,1 M y 0,02M, respectivamente, y la solución se agita durante toda la noche a 4°C. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por la sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna quelante de metales (guanidina 6M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micras para purificar. El extracto purificado se carga en una columna quelante Qiagen de Ni²⁺-NTA de 5 ml equilibrada en el tampón de la columna quelante de metal. La columna se lava con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, grado Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada se agrupan y guardan a 4°C. La concentración de proteínas se estima por su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado en base a su secuencia de aminoácidos.

[0454] Las proteína se renaturalizan diluyendo la muestra lentamente en tampón de renaturalización preparado fresco que consiste en: Tris 20 mM, pH 8,6; NaCl 0,3 M; urea 2,5 M; cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de renaturalización se eligen para que la concentración final se encuentre entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de renaturalización se agita suavemente a 4°C durante 12-36 horas. La reacción de renaturalización se desactiva mediante la adición de TFA hasta una concentración final de 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de una purificación adicional de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micras y se añade acetonitrilo hasta una concentración final de 2-10%. La proteína renaturalizada se cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H con un tampón móvil de TFA al 0,1% con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80%. Se analizan alícuotas de fracciones con una absorbancia A₂₈₀ en geles de poli(acrilamida)-SDS y se agrupan las fracciones que contienen la proteína renaturalizada homogénea. En general, las muestras renaturalizadas de manera adecuada de la mayoría de proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo, ya que estas muestras son las más compactas con sus interiores hidrofóbicos resguardados de la interacción con la resina de fase inversa. Las muestras agregadas se eluyen normalmente a concentraciones de acetonitrilo superiores. Además de separar las formas mal plegadas de las proteínas de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.

[0455] Las fracciones que contienen el polipéptido TAT plegado deseada se agrupan y se elimina el acetonitrilo con una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y manitol al 4% mediante diálisis o mediante filtración en gel utilizando resinas Superfine G25 (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y filtradas de forma estéril.

[0456] Algunos de los polipéptidos TAT descritos aquí se han expresado de manera satisfactoria y purificado utilizando técnica o técnicas.

EJEMPLO 15: Expresión de TAT en células de mamíferos

5 **[0457]** Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada de TAT mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

[0458] El vector pRK5 (véase, EP 307.247 publicada el 15 de marzo de 1989) se utiliza como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN de TAT se liga en el pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de TAT utilizando procedimientos de unión tales como los descritos en Sambrook et. al., *supra*. El vector resultante se denomina pRK5-TAT.

10 **[0459]** En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se desarrollan hasta la confluencia en placas de cultivo de tejidos en un medio tal como DMEM suplementado con suero de ternera fetal y opcionalmente, componentes nutricionales y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-[TAT] con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen de ARN VA [Thimmappaya et. al., *Cell*, 31:543 (1982)] y se disuelve en 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl₂ 0,227 M.

15 A esta mezcla se le añade, gota a gota, 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO₄ 1,5 mM, y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. A continuación, las células 293 se lavan con medio sin suero, se añade medio fresco y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

20 **[0460]** Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se extrae y se reemplaza por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml de ³⁵S-cisteína y 200 µCi/ml de ³⁵S- metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recoge el medio condicionado, se concentra en un filtro de centrifugación y se carga en un gel SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un período de tiempo concreto para revelar la presencia del polipéptido TAT. Los cultivos que contienen células transfectadas

25 pueden experimentar una incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se examina en bioensayos concretos.

[0461] En una técnica alternativa, se puede introducir TAT en células 293 transitoriamente utilizando el procedimiento del sulfato de dextrano descrito por Somparyrac et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12: 1575 (1981). Las células 293 se desarrollan hasta la máxima densidad en un matraz giratorio y se añaden 700µg de ADN de pRK5 - TAT. En primer lugar, las células se concentran a partir del matraz giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano es incubado en el residuo celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido, y se reintroducen en el matraz giratorio que contiene el medio de cultivo de tejidos, 5 µg/ml de insulina bovina y 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio condicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y restos celulares. La muestra que contiene el TAT expresado se puede concentrar a continuación y purificar mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como la diálisis y/o cromatografía en columna.

30

35

[0462] En otra realización, puede expresarse TAT en células CHO. El vector pRK5-TAT puede transfectarse en células CHO utilizando reactivos conocidos, tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Tal y como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio puede sustituirse por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador, tal como ³⁵S-metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido TAT, el medio de cultivo puede sustituirse por medio sin suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y, a continuación, se recoge el medio condicionado. A continuación, el medio que contiene el TAT expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

40

[0463] El TAT etiquetado con epítipo puede expresarse también en células CHO huéspedes. El TAT puede subclonarse fuera del vector pRK5. El inserto del subclón puede someterse a PCR para fusionarse en el marco con una etiqueta epítipo seleccionada, tal como una etiqueta de poli-His en un vector de expresión de Baculovirus. El inserto de TAT etiquetado con poli-His puede subclonarse a continuación en un vector dirigido por SV40 que contiene un marcador de selección, tal como DHFR, para seleccionar clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (tal como se ha descrito anteriormente) con el vector dirigido por SV40. El marcaje puede realizarse, tal como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el TAT etiquetado con poli-His expresado puede a continuación concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de quelato con Ni²⁺.

45

50

[0464] TAT también se puede expresar en células CHO y/o COS mediante un procedimiento transitorio o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

55 **[0465]** La expresión estable en células CHO se realiza utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción IgG (inmuno adhesina), en la que las secuencias codificantes de las formas solubles (por ejemplo, los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan a una secuencia de región constante de IgG1 que contiene la bisagra, CH2 y los dominios de CH2 y/o es una forma etiquetada de poli-His.

[0466] Tras la amplificación por PCR, los ADNs respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO utilizando técnicas estándar descritas en Ausubel et. al., Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para tener sitios de restricción 5' y 3' compatibles del ADN de interés para permitir el traslado adecuado de los de ADNc. El vector utilizado para la expresión en las células CHO es tal y como se describe en Lucas et. al., Nucl. Acid Res. 24:9 (1774-1779 (1996), y utiliza el promotor/potenciador temprano de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

[0467] Se introducen doce microgramos del ADN plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reactivos de transfección Superfect® (Quiagen), Dosper® o Fugene® (Boehringer Mannheim) disponibles comercialmente. Las células se desarrollan tal y como se describe en Lucas et. al., *supra*. Se congelan aproximadamente 3×10^7 células en una ampolla para el crecimiento y producción posterior tal y como se describe a continuación.

[0468] Las ampollas que contienen el ADN plasmídico se descongelan mediante la colocación en un baño de agua y se mezclan mediante agitación. El contenido se pipetea en un tubo de centrifuga que contiene 10 mL de medio y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a $0,2 \mu\text{m}$ con suero bovino fetal al 5% dialfiltrado a $0,2 \mu\text{m}$). A continuación, las células se fraccionan en un agitador de 100 mL que contiene 90 mL de medio selectivo. Después de 1-2 días, las células se transfieren a un agitador de 250 mL lleno con 150 mL de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37°C . Después de otros 2-3 días, se siembran 3×10^5 células/mL en agitadores de 250 mL, 500 mL y 2000 mL. El medio celular se cambia por medio fresco mediante centrifugación y resuspensión en el medio de producción. Aunque se puede utilizar cualquier medio de CHO adecuado, en realidad se puede utilizar un medio de producción descrito en la patente de Estados Unidos No. 5.122.469, concedida el 16 de junio de 1992. En un agitador de producción de 3L se siembra a razón de $1,2 \times 10^6$ células/mL. En el día 0, se determina el número de células y el pH. En el día 1, se toman muestras del agitador y se inicia el burbujeo con aire filtrado. En el día 2, se toman muestras del agitador, la temperatura se cambia a 33°C , y se añaden 30 mL de glucosa 500g/L y 0,6 mL de antiespuma al 10% (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano al 35%, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). Durante toda la producción, el pH se ajusta según la necesidad manteniéndose en valores alrededor de 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad cae por debajo del 70%, el cultivo celular se recoge mediante centrifugación y se filtra a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$. El filtrado se guarda a 4°C o se carga inmediatamente en columnas para la purificación.

[0469] Para las construcciones etiquetadas de poli-his, las proteínas se purifican utilizando una columna de Ni^{2+} -NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio condicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio condicionado se bombea en una columna de 6 ml de Ni^{2+} -NTA equilibrada en Hepes20 mM, pH 7,4, tampón que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min. a 4°C . Tras cargarse, la columna se lava con un tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrio que contiene imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene Hepes10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se guarda a -80°C .

[0470] Las construcciones de inmunoadesina (que contiene Fc) se purifican a partir del medio condicionado tal y como se indica a continuación. El medio condicionado se bombea en una columna de Proteína A (Pharmacia) de 5 ml que ha sido equilibrada en un tampón de fosfato sódico20 mM, pH 6,8. Después de cargarse, la columna se lava ampliamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 μL de tampón Tris 1M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento, tal como el descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-his. La homogeneidad se valora mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante la secuenciación de los aminoácidos N-terminales mediante degradación Edman.

[0471] Algunos de los polipéptidos TAT descritos aquí se han expresado de manera satisfactoria y purificado utilizando esta técnica o técnicas.

EJEMPLO 16: Expresión de TAT en levadura

[0472] El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de TAT en levadura.

[0473] En primer lugar, los vectores de expresión de levadura se construyen para la producción o secreción intracelular de TAT a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica TAT y el promotor se insertan en los sitios para enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de TAT. Para la secreción, el ADN que codifica TAT puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal TAT nativo u otro péptido señal de mamífero, o, por ejemplo, una secuencia señal/líder secretora del factor alfa o invertasa de levadura, y secuencias enlazadoras (si se necesitan) para la expresión de TAT.

[0474] Las células de levadura, tales como la cepa AB110 de la levadura, pueden a continuación transformarse con

los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y una separación mediante SDS-PAGE, seguido de la tinción de los geles con azul de Coomassie.

5 **[0475]** El TAT recombinante puede aislarse posteriormente y purificarse mediante la extracción de las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y, a continuación, la concentración del medio utilizando filtros de cartucho específicos. El concentrado que contiene TAT puede purificarse adicionalmente utilizando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

[0476] Algunos de los polipéptidos TAT descritos aquí se han expresado de manera satisfactoria y purificado utilizando esta técnica o técnicas.

10 EJEMPLO 17: Expresión de TAT en células de insectos infectadas de Baculovirus

[0477] El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de TAT en células de insectos infectadas de Baculovirus.

15 **[0478]** La secuencia que codifica para TAT se fusiona en dirección 5' de un epítipo etiqueta contenido en un vector de expresión de baculovirus. Dichas epítipo etiquetas incluyen etiquetas de poli-His y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Pueden utilizarse una variedad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de los plásmidos disponibles comercialmente, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica TAT o la parte deseada de la secuencia codificante de TAT, tal como la secuencia que codifica un dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular, se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios para enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto se digiere a continuación con todas esas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

25 **[0479]** El baculovirus recombinante se genera mediante la cotransfección del plásmido anterior y el ADN del virus BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y se utilizan para amplificaciones adicionales. La infección viral y la expresión de la proteína se realizan tal y como se describe en O'Reilly et. al., *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

30 **[0480]** A continuación, TAT etiquetado con poli-His expresados puede purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺-quelato tal y como se indica a continuación. Los extractos se preparan a partir de las células recombinantes Sf9 infectadas del virus tal y como se ha descrito por Rupert et. al., *Nature*, 362: 175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en el tampón de sonicación (25 ml de HEPES, pH 7,9; MgCl₂ 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; KCl 0,4 M), y se sonican dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se depuran por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en el tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml del tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta la línea base a A₂₈₀ con el tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de la fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye la proteína no unida específicamente. Después de alcanzar la línea base a A₂₈₀ de nuevo, la columna se desarrolla con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia Western con Ni²⁺-NTA-conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen el TAT etiquetado con His₁₀ eluido se agrupan y se dializan contra el tampón de carga.

45 **[0481]** Alternativamente, la purificación del TAT etiquetado con IgG (o con Fc) puede realizarse usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna con Proteína A o proteína G.

[0482] Algunos de los polipéptidos TAT descritos aquí se han expresado de manera satisfactoria y purificado utilizando esta técnica o técnicas.

EJEMPLO 18: Purificación de polipéptidos TAT utilizando anticuerpos específicos

50 **[0483]** Los polipéptidos TAT nativos o recombinantes se pueden purificar mediante una variedad de técnicas estándar en las técnicas de purificación de proteínas. Por ejemplo, se purifica el polipéptido pro-TAT, el polipéptido TAT maduro, o el polipéptido pre-TAT mediante cromatografía de inmovilización usando anticuerpos específicos para el polipéptido TAT de interés. En general, se construye una columna de inmovilización por acoplamiento covalente de anticuerpos anti-polipéptido TAT a una resina de cromatografía activada.

55 **[0484]** Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de sueros inmunes mediante precipitación con sulfato de amonio o mediante purificación en la Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Así mismo, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de los fluidos ascíticos de ratón mediante la

precipitación con sulfato de amonio o cromatografía en Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica, tal como la SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 **[0485]** Dicha columna de inmunoafinidad se utiliza en la purificación del polipéptido TAT mediante la preparación de una fracción a partir de células que contienen polipéptido TAT en una forma soluble. Esta preparación se deriva por solubilización de toda la célula o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial por adición de detergente o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente, el polipéptido TAT soluble que contiene una secuencia señal puede secretarse en una cantidad útil en el medio en el que las células crecen.

10 **[0486]** Una preparación que contiene polipéptido TAT soluble se pasa por la columna de inmunoafinidad, se lava en condiciones que permiten la absorción preferencial del polipéptido TAT (por ejemplo, tampones de fuerza iónica elevada en presencia de detergente). A continuación, la columna se eluye en condiciones que interrumpen la unión anticuerpo/polipéptido TAT (por ejemplo, un tampón de pH bajo, tal como aproximadamente un pH de 2-3, o una alta concentración de caótropro, tal como urea o ión tiocianato), y se recoge el polipéptido TAT.

15 Depósito de material

[0487] Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

Tabla 11

Material	ATCC Dep. No.	Data del depósito
Línea celular de hibridoma 3A5.3	PTA-6695	4 de mayo del 2005
Línea celular de hibridoma 11D10.1.14	PTA-6696	5 de mayo del 2005

20 **[0488]** Estos depósitos se realizaron según lo estipulado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el Reglamento bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha del depósito. Los depósitos estarán disponibles mediante la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y están sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, lo que asegura la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie del cultivo del depósito al uso público tras la publicación de la respectiva patente estadounidense o tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, la que sea primera, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por la U.S. Commissioner of Patents and Trademarks para tener el derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas de la Commissioner según las mismas (incluyendo 37 CFR § 1.14 con referencia concreta a 886 OG 638).

30 **[0489]** El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en el depósito muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente reemplazados en una notificación por otros iguales. La disponibilidad del material depositado no se interpreta como una licencia para realizar la invención contraviniendo los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

35

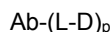
REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado que comprende tres regiones hipervariables de cadena ligera (HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3) y tres regiones hipervariables de cadena pesada (HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3), en el que:
 - (a) HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:119;
 - 5 (b) HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NOS:120-121;
 - (c) HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:122;
 - (d) HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:123;
 - (e) HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NOS:124-127; y
 - (f) HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NOS:128-183,
- 10 cuyo anticuerpo se une a un epítipo que tiene los aminoácidos 3765-6397 del polipéptido que tiene la secuencia mostrada como SEC ID NO:2.
2. Anticuerpo aislado según la reivindicación 1, donde HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NOS: 129-183.
- 15 3. Anticuerpo aislado según la reivindicación 1, donde HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NOS: 131, 142, 144, 152, 155, 174, 180 y 183.
4. Anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además una o ambas de (i) una secuencia de armazón de consenso humana aceptora de VH de cualquiera de las SEC ID NOS:184-193, y (ii) una secuencia de armazón de consenso humana aceptora de VL de cualquiera de las SEC ID NOS:194-197.
- 20 5. Anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además una o más de (i) una secuencia de armazón de consenso humana aceptora de VH de SEC ID NOS: 192 o 193, y (ii) una secuencia de armazón de consenso humana aceptora de VL de SEC ID NO:194.
6. Anticuerpo aislado según la reivindicación 5, que comprende además ambas de (i) una secuencia de armazón de consenso humana aceptora de VH de SEC ID NOS: 192 o 193, y (ii) una secuencia de armazón de consenso humana aceptora de VL de SEC ID NO:194.
- 25 7. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una o ambas de (i) la secuencia de VH mostrada tal como se muestra en cualquiera de SEC ID NOS:198-209 y (ii) la secuencia de VL mostrada como SEC ID NO:211.
8. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una o ambas de (i) la secuencia de VH mostrada como SEC ID NO: 208 y (ii) la secuencia de VL mostrada como SEC ID NO:211.
- 30 9. Anticuerpo según la reivindicación 1 que es un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
10. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico; un agente citotóxico que es una toxina, un antibiótico, un isótopo radioactivo o una enzima nucleolítica; o una toxina que es un maitansinoide o una caliqueamicina.
- 35 11. Anticuerpo según la reivindicación 10, que induce la muerte de una célula a la que se une, donde dicha célula es opcionalmente una célula de cáncer de ovario.
12. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que se marca para su detección.
13. Método de diagnóstico de la presencia de un tumor en un mamífero, comprendiendo dicho método poner en contacto una muestra de prueba de células de tejido obtenidas de dicho mamífero con un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y detectar la formación de un complejo entre dicho anticuerpo y un polipéptido TAT10772 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO:2 en la muestra de prueba, donde la formación de un complejo es indicativo de la presencia de un tumor en dicho mamífero, donde dicho tumor es opcionalmente un tumor de ovario, mama o páncreas.
- 40 14. Anticuerpo según la reivindicación 10 para utilizar en un método de inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa un polipéptido TAT10772 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO: 2, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con dicho anticuerpo, donde la unión de dicho anticuerpo a dicho polipéptido provoca la inhibición del crecimiento de dicha célula.
- 45 15. Anticuerpo según la reivindicación 10 para utilizar en un método de tratamiento terapéutico de un mamífero que

tiene un tumor canceroso que comprende células que expresan un polipéptido TAT10772 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 2, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo.

- 5 16. Anticuerpo para utilizar según la reivindicación 14 ó 15, donde dicha célula es una célula de cáncer de ovario, o dicho tumor canceroso es un tumor de ovario.

17. Conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende un anticuerpo unido covalentemente por un enlazador a uno o más grupos farmacológicos, teniendo el compuesto la fórmula:



donde:

- 10 Ab es un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;

L es un enlazador:

D es un grupo farmacológico; y

p es 1 a 20.

- 15 18. Conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 17, donde D es un maitansinoide, una auristatina; un maitansinoide que es DM1, o una auristatina que es MMAE o MMAF; y/o L es MC-val-cit-PAB, MC, SMCC, SPP, o BMPEO; y/o que tiene la fórmula Ab-MC-val-cit-PAB-MMAE, Ab-MC-val-cit-PAB-MMAF, Ab-MC-MMAE, Ab-MC-MMAF, Ab-SPPDM1 o Ab-SMCC-DM1.

- 20 19. Conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 18, donde el anticuerpo comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO:119, una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:120 o 121, una HVRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:122, una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:123, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NOS:124-127, y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:128; o tanto la secuencia VH mostrada como SEC ID NO:11 como la secuencia VL mostrada como SEC ID NO:9.

- 25 20. Compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, donde el anticuerpo se une al enlazador a través de un tiol de cisteína del anticuerpo.

- 30 21. Formulación farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo y fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, y (i) un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable; o (ii) un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico seleccionado entre letrozol, oxaliplatino, doxetaxel, 5-FU, leucovorina, lapatinib, y gemcitabina.

- 35 22. Método de inhibición de la proliferación celular que comprende tratar células tumorales de mamífero que expresan un polipéptido TAT10772 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 2 en un medio de cultivo celular con un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, mediante lo cual se inhibe la proliferación de las células tumorales; donde las células tumorales de mamífero son opcionalmente células tumorales de ovario.

23. Formulación farmacéutica según la reivindicación 21 para utilizar en un método de tratamiento de un cáncer que expresa el polipéptido TAT10772, donde el polipéptido TAT10772 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO: 2; donde el cáncer es opcionalmente cáncer de próstata, cáncer del tracto urinario, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon o cáncer de ovario.

- 40 24. Formulación farmacéutica para utilizar según la reivindicación 23, donde el cáncer es cáncer de ovario, mama o páncreas.

25. Formulación farmacéutica para utilizar según la reivindicación 23 ó 24, donde dicho método comprende además la administración de un agente quimioterapéutico, donde el agente quimioterapéutico se selecciona entre letrozol, oxaliplatino, doxetaxel, 5-FU, leucovorina, lapatinib, y gemcitabina.

- 45 26. Método in vitro para determinar la presencia de un polipéptido TAT10772 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO. 2 en una muestra que comprende una célula cancerosa sospechosa de expresar dicho polipéptido, comprendiendo dicho método exponer dicha muestra a un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y determinar la unión de dicho anticuerpo a dicho polipéptido en dicha muestra, donde la unión del anticuerpo a dicho polipéptido es indicativo de la presencia de dicho polipéptido en dicha muestra.

- 50 27. Método según la reivindicación 26, donde dicha célula cancerosa es una célula de cáncer de páncreas, mama u ovario.

Figura 1B

ACAGAAATAATGTCCTCTAATAGAACACACATCCCTGACTCTGATCAGTCCACGATGTCTCCAGACATCATCTGA
 AGTGATCACCAGGCTCTCTTCTCATCCATGATGTGAGATCAACACAAATGACCATCACCACCAAAAGTCTC
 CTGGGGCTACAGCACAGAGTACTCTTACCTTGGCCACAACACAGCCCCCTTGGCAAGGACCCACTCACTGTTCCT
 CCTAGATTTTTTCACTCAGAGATGACAACTCTTATGAGTAGGAGTCTGAAAAATCCATCATGGAAGAGCTCTCCCTT
 TGTGGAAAAAAGTACTGCTCTTCTCTCTCTCTGTTGTCTTACCTGTACAGACCTCACCTTCTGTTTCTCCACATTAC
 CGCAGAGTATCCCTTCTCTCTCTTCTCTGAGCTTCACTCTCACCAGGATGAGTGAAGACTACAGACACAAAGC
 ACAGAACTCGAAACCAAGTTTATCTCCAAATCTGAGTGGCACCTCAGTTGAAATACTGGCTGCCTCTGAAGTCAACAC
 AGATACAGAGAAATTCATCTCTCTTCAAGCATGGCAGTGACCAATGTGGGAACCAACAGTTCTGGACATGAACATAT
 ATTCTCTGTTTCAATCCACTCGGAGCCATCCAGGCTACATACCCAGTGGGTACTCCCTCTCCATGGCTGAJACC
 TCTATTCCACATCAATGCCCTGCTAATTTTGAAGCCACAGGATTTGAGGCTGAGCCATTTCTCATTTGACTTCTGG
 ACTTAGGAAGACCAACATGTCCCTGGACACAGCTCAGTCAACCAACAAATACACCTTCTCTCTGGGTCCACCTC
 ACCTTTTACAGAGTTCCAAAGACTGATTTCACTCTCTCTGCAAAAACATCATCCCAGAGTGGCTCCAGGCTCAGAG
 TATACTGAAATTCAGTGGACATAATCACCCCCTTTAATGCTTCTCCATCTATTACGGAGTCCACTGGGATAACCTC
 CTTCACCAATCCAGGTTTACTATGTCTGTAAACAGAAAGTACTCATCATCTGAGTACAGATTGCTGCCTCAGCTG
 AGACTATTTCACACTGGCAGCAGTGATGCCCTCTCTATCAGAGGCCATGACTTCAATTGCAACACTGGAGTTCCACGA
 GCCATCTCAGGTTTCAAGTAGTCCATTCTCTAGGACAGAGTCAAGGCCCTGGGGATGCTACTCTGTCCACCATTCGAGA
 GAGCTCTCCCTTCACTCACTCTGTGCCATTCTCTCTTCAACCTTCACTACCACTGATTTCTTCAACCATCCAGGCC
 TCCATGAGATAAATCTCTCTCTCAGCTACCCCATATAGAGTGGACACAGTCTTGGGACAGAGAGCAGCACTGAA
 GGAGCTCTGGTTATGGTCACTTTTGGACACTTCAAGCCAAACAGGACAGGACATCTTCACTACCCATTTTGGATAC
 CAGATAGACAGAGAGCTTGGCTGGGAAACAGTGAAGTGTCTTATCAAGTTCTCTCACTCTCAACCGGTGACAA
 GAATCTGATGCAATATGGAACACATCAAAAAATACCAATGAAGCAGCACACAGAGGTACCATGAAGCAGTCAAA
 GGCTCTCAGACATCCACTTGCCTGCGCTGCTTAAAGGACTACACACAGAGGGGACAAAAAGATGGAGACCAACAC
 CACAGCTCTGAAGACCAACCAACAGCTCTGAAGACCACTTCCAGAGCCACCTTGACCAACAGTGTCTATATCCCA
 CTTTGGGAACACTGACTCCCTCAATGCTCAATGCAAAATGGCCAGCAAAATCCCAACAGAAATGATGATCAACACC
 CCATATGTTTTTCCCTGATGTTCCAGAAACGACATCTCTCATTTGGCTACAGGCTGGGAGCAGAAACAGCAAGCTCT
 TCCAGAGCAACCCCATCTGTTTTCAATAGAGAAATCAGAGACCAAGGCTCACTGGTCTCTGTTCTGGGGCAGAGA
 GAATCTCGGTATTTCAAACTCTAGATGTTTCTCTAGTGGCCAGATACAAACAGCTTCAATGGGTATCTCTGCA
 GAGACCTTCCAACTGTTTCCAGAGCAACCCCAATTTTTCACAGTGAATAGACACTGTATCTTCCACAGCCAC
 CAGTCAATGGGGCAGAGCTCAGCTCAGCCATTCCAAACAAATATCTCAGCTAGTGAATAGATGCACTGACCCCACTGG
 TCACTATTTTGGGGCAGATAGTATCAACATTTCCAAACATGACTAAGTCCCAATGAAACAGAGACCAAGAAC
 ACATCTGCTCACTCTCTGACAGACACAGCTCAACTATTCCAGAACAAATCCCAATTTTCTCATCATGAATCAGA
 TGCCACACCTTCAATAGCCACAGTCTGGGGCAGAAACAGTTCACTATTCCAAATATGACTGTCTCACCTGGTG
 CAGAAGATCTGGTGACCTCAGAGTCACTAGTTCTGGCAGACAGAAATATGACTATTCCAACTTTGACTCTTTCT
 CTTGGTGAACCAAGACCATAGCCCTCATAGTCACTTACCCATCTGAAAGCAGACAAAGTTCCGGCCATTCCAACTTCAAC
 TATCTGCTGCTGTATCAGGTTGGTGACCTCAATGGTCAACAGTTTGGGGCAGAAAGCAAGTACAACTAATGGAG
 CTCTGACAAACTCCCTGGTGAACAGCTCAACAGTTTCAATGGTCAAGCATCTGACAGACCCCAACAGTT
 CCCTGGCAACTTCCATTTTTTCCATAGTAAATCAGACACCAACCTTCAATGACCCACAGTCAATGGGGCAGAAATC
 CAGTTCACTGTTTCCAACTCCAACTGTTTCAACTGAGGTACAGGAGTAGTGACCCCTTGGTCAACAGTTCTAGGG
 CAGTGATCAGTCAAACTATTCCAACTTCTGACTTTTCTCTGGTGAACAGAGACCAACCTTCAATGGGCCACAGT
 CATGGGGAAAGCCAGTTCTGTATTCCAACTCCAACTGTTTCACTGGGGTACAGGAGTGGTGACCTCTCTGGT
 CACTAGTTCTAGGGCAGTGACTAGTACAACTATTCCAACTCTGACTTTTCTCTTGGTGAACAGAGACCAACCTT
 CAATGGCCACAGTCAATGGGACAGAGCTGGCTCAGCTGTTCCAACTGTTTACCTGAGGTACAGGAATGGTGACC
 TCTCTGGTTGCTAGTTCTAGGGCAGTAAACAGTACAACTCTTCCAACTCTGACTCTTCTCTGGTGAACAGAGAC
 CACACCTTCAATGGCCACAGTCAATGGGGCAGAGCCAGCTCAACTGTTCCAACTGTTTCACTGAGGTACAGGAG
 TGGTGACCTCTCTGGTCACTAGTTCTAGTGGAGTAAACAGTACAACTATTCCAACTCTGATTCTTCTCTGGTGAA
 CTAGAAACCAACCTTCAATGGCCACAGTCAATGGGGCAGAGCCAGCTCAGCTGTTCCAACTCCAACTGTTTCACT
 TGGGGTATCAGGAGTGGTGACCCCTCTGGTCACTAGTTCCAGGGCAGTGACAGTACAACTATTCCAACTTCAACTC
 TTTCTCTAGTGAAGCAGAGACCAACCTTCAATGGGCCACAGTCAATGGGGTAGAAGCCAGCTCAGCTGTTCTAACT
 GTTTCACCTGAGGTACAGGAATGGTGACCTTTCTGGTCACTAGTTCTAGAGCAGTAAACAGTACAACTATTCCAACT
 TCTGACTATTCTCTGATGAACAGAGACCAACCTTCAATGGTCAACCACTTCTGAGGCAAGATGATTTAGGCCA
 TTTCCAACTTATGGTGTCTCCCTACTGTACAAAGGGCTGGTGACTTCACTGGTCACTAGTTCTGGGTGAGAGACAGT
 GCGTTTTCAAACTCAACTGTTGCTCAAGTCAACAGAGACCATAGACTCATGGGTGCTCATCTGGGACAGAAAGC
 AAGTTCTGTTGTTCCAACTTTGACTGTCTCCACTGGTGAGCCGTTTCAAAATATCTCATTTGGTCAACCATCTGCGAG
 AGAGTAGCTCAACTCTTCCAGGACCACTCAAGGTTTCCCAAGTGAATAGACACTATGCTTCTACAGTCACTC
 AGTCTGAGGACAGAACTCAGCTCAGCCATTCAACAACTATTCACTGGTATACAGGTTGTGACATCACTGGT
 CACTAGCTCTGGGAGAGACATCAGTGCACTTTTCCAACTGCTGAGTCCCACTGAAATCAGAGGCAACAGGCT
 CATGGGTACTCATCTGCACTCAGGACCAACAGTTCCAGGACCAACCCCTAATTTATTTCTCATAGTGAACAGAC
 ACCACACCATCAATAGCCACAGTCTGGGGCAGAAACCACTTCAAGTTTTCCAACTAATAGTGTCTCAGCTGATGT
 ACCAGATATGGTAACTCAGGTCAGTGTCTGGGACAGACACAGTATAACTATTCCAACTCTGACTCTTTCTT
 CTGGTGAGCCAGAGACCAACCTCATTTATCACTATTCTGAGACATACAAAGTTTCAAGCATTTCCAACTCTCCCT
 GTCTCCCTGATGCAATCAAGATGTGACCTCACTGGTCACTGTTCTGGGACAGACAGCACTACAACTTTCCAACT
 ACTGACGAGACCCCATATGAACAGAGACCAACAGCCATACAGCTCATCTCTGACAGACCAACCAATGGTTT
 CCAGGACAACTCCCAAGTTTTCCCATAGTAACTCAGACACCACTCCCACTAGCCATCACCAGTCTGGGCCAGAA

Figura 1C

GCCAGTTCAGCTGTTTCAACGACAACATCTCACCTGATATGTCAGATCTGGTGACCTCACTGGTCCCTAGTTCCTGG
 GACAGACACCCAGTACAACTTCCCAACATTGAGTGAGACCCCATATGAAACAGAGACTACAGGCAAGTGGCTCACTC
 ATCCTGCAGAAACAGCACACCGTTTCTGGGACAATTCCCAACTTTTCCCATAGGGGATCAGACACTGCACCTC
 ATGGTCACCACTCTGGAGTAGACACGAGGTGAGTGTTCCTCAACTACCAACATCCACCCAGTATACACGGGTAGT
 GACCTCACAGGTCACTAGTTCGCAACAGACACTAGTACAGCTATTCCAACTTTGACTCCTTCTCCTGGTGAACAG
 AGACCAACAGCTCATCAGCTACCCATCCTGGGACACAGACTGGCTTCACTGTTCCAAATTCGGAGTGTTCCTCTAGT
 GAGCCAGATACAATGGCTTCTGGGTCACTCATCTCCACAGACCCAGCACCTGTTTCCAGAACAACTCCAGTTT
 TTCCCATAGTATCCAGATGCCACCTGTAATGGCCACAGTCTTAGGACAGAAAGCCAGTTTCAGCTGTAAGTACAA
 CAATCTCACCTGGTGACACAGAGATGGTGACTTCAAGATCACTAGTTCGGGGACAGCAACCCAGTACAACTGTTC
 ACTTTGACTCATCTCCTGGTATGCCAGAGACCAAGCCTTATTGAGCACCCATCCAGAACAGAGACAAAGTAAAC
 ATTTCTGCTTCAACTGTGTTCTCTCAAGTATCAGAGACCAAGCCTCACTACCATTAGACCTGGTGACAGACTA
 GCACAGCTCTCCAACTCAGAACACATCTCTCTTCACTCTTGTAACTGGAAACAGCAGAGTTGATCTAAGT
 CCAACTGCTTCACTGGTGTTCGCAAAACAGCCCACTTTCCACCCATCCAGGGACAGAAACAGACCAATGAT
 TCCAACTTCAACTCTTTCCCTGGTTTACTAGAGACTACAGGCTTACTGGCCACAGCTCTTCAGCAGAGACAGCA
 CGAGTACTTCACTCTGACTGTTTCCCTGCTGTCTCTGGGCTTTCCAGTCCCTTATTAACAACTGATAGCCCA
 ACTGTGACCTCCTGGAAACAGAAACCTCACCATCTGTAACCTTCAGTTGGACCCCCAGAAATTTCCAGGACTGTAC
 AGGCACCACTATGACCTTGAATACCATCAGAGATGCCAACACCACTTAAACAGTCTAGGAGAAAGGAGTGAAGTCCAA
 CCAATCTCTGAGAACTACAATGGTTGAAGCCACTAATTTAGCTACACAGGTTCCAGTCCCACTGTGGCCAAAGACA
 ACAACCACTTCAATACACTGGCTGGAAAGCCTCTTACTCTCTGACCAACCTGGGATGTCCACCTTGGCCCTGGA
 GATGTGACCTCAAGAACAGTTATAACCATCGTCTGGATCTCCACCAACAGCAGTTATAACCGTGGCTGGA
 CCCCAGCAGCAGCACTCCAGTGACTTCTACATTTCTCCCAAGGGATTCCACATCTCCATCCCACTCCAGCCTCAACAG
 GCCACAGTCCCATTCATGGTGCCATTCACCTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTT
 CCTGGTTCAAGGAAGTTCAACGCCACAGAGAGAGAACTGCAGGGTCTGCTCAAAACCTTGTTCAGGAATAGCAGT
 TGGAAATACCTTATTAGGCTGCAGACTAGCCTCACTCAGGCCAGAGAAAGGATAGCTCAGGCCAGGAGTGGATG
 ATCTGCACACATCGCCCTGACCTGAAAGACTCGGACTGGACAGAGAGCGACTGTACTGGGAGCTGAGCAATCTGAC
 AAATGGCTCCAGGAGCTGGGCCCTTACACCTGGACCGGAACAGTCTCTATGTCAATGGTTTCCACCATTCGGAAGCT
 CTATGCCACCAACAGCACTCCTGGGACCTCCACAGTGGATGTGGGAACCTCAGGGAATCCATCTCCTCCAGCCAGC
 CCCACAGCTGTGGCCCTCTCCTGATGCGCTTCACTCCTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTT
 GGTGCTGACCTCCAGGAAGTTCAACACCATGGAGAGTGTCTGAGGGTCTGCTCAAGCCATTTGTTCAAGAAC
 CCAAGTGTGGCCCTTGTACTCTGGCTGACAGTTGACCTTGTCTCAGGCCAGAAAGATGGGGCAGCACTGGAGT
 GATGCCATCTGACCCACCGCTTGAACCCCAAGCCCTGGACTCAACAGGAGCAGCTGTACTGGGAGTGAAGCA
 ACTGACCAATGACATTGAAGAGCTGGGCCCTTACACCTGGACAGGAACAGTCTCTATGTCAATGGTTTCAACCATC
 AGAGCTCTGTGTCCACCAACAGCACTCCTGGGACCTCCACAGTGGATCTCAGAACCTCAGGGAATCCATCTCCTCT
 TCCAGCCCAACAAATATAGCTGTGGCCCTCTCCTGGTACCAATCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTT
 TGGGAGGACATGGGTCACTCTGGCTCCAGGAAGTTCAACACCAAGAGAGGCTCCTGACGGGTCTGCTTGGTCCCA
 TATTCAAGAACACCACTGTTGGCCCTCTGACTCTGGCTGACAGCTGACCTCTCTCAGGTCCAGAAAGGATGGAGCA
 GCCACTGGAGTGGATGCCATCTGCATCCATCTTGAACCCCAAGCCCTGGACTCAACAGAGAGCGGCTGTACTG
 GGAGCTGAGCCCACTGACCAATGGCATCAAGAGCTGGGCCCTTACACCTGGACAGGAACAGTCTCTATGTCAATG
 GTTTCACCATCCGACCTCTGTGCCCAACAGCACTCTGGGACCTCCACAGTGGACCTTGGAACTCAGGGAAT
 CCAATCTCCTCCCAAGCCCGCACTGTGGCCCTCTCCTGGTGTGTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTT
 GAAGTATGAGGAGGACATGCATCGCCCTGCTCCAGGAAGTTCAACACCACTGAGAGGCTCCTGACAGCCTGGTGT
 GTCTATGTTCAGAACACCACTGTTGGCCCTCTGTAATCTGGCTGACAGCTGACCTTGTCTCAGGTCCAGAAAGGAT
 GGAGCAGCCATGGAGTGGATGCCATCTGACCCACCGTCTTGACCCCAAGCCCTGGAGTGGACAGGAGCAGCT
 ATACTGGGAGCTGAGCCAACTGACCAATGGCATCAAGAGCTGGGCCCTTACACCTGGACAGGAACAGTCTCTATG
 TCAATGGTTTCAACCATGGATCCTCTGTGCCCAACAGCAGCAACCTGGGACCTCCACAGTGGACCTTGGGTGAGG
 ACTCCATCTCCTCCCAAGCCCAAGTGTACTGTGGCCCTCTCCTGGTGGCTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTT
 CACCAACCTGAAAGTACAGGAGGACATGCAATGGCTGGCTCCAGGAAGTTCAACACCAAGAGAGAGTCTGACAG
 GTCTGTCTGGTCCATGTTCAAGAACACCACTGTTGGCCCTCTGTAATCTGGCTGACAGCTGACCTTGTCTCAGTCC
 GAGAAGGATGGAGCAGCCACTGGAGTGGATGCCATCTGACCCACCGTCTTGACCCCAAGCCCTGGAGTGGACAG
 GGAGCAGCTATACTGGGAGCTGAGCCAGCTGACCAATGGCATCAAGAGCTGGTCCCTTACACCTGGACAGAAACA
 GTCTCTATGTCAATGGTTTCAACCATCAGACCTCTGGGCCAACACAGCACTCCTGGGACCTCCACAGTGGACCTT
 GGACCTCAGGGAATCCATCTCCTCCCTCCCAAGCCCTTACATCTGCTGGCCCTCTCCTGGTGGCATTCACCTCACTT
 CACCATCAACACCTGCAGTACAGGAGGACATGCAATCAACAGGCTCCAGGAAGTTCAACACCAAGAGCGGGTCC
 TGCAGGGTCTGCTTGGTCCCATGTTCAAGAACACCACTGTTGGCCCTCTGTAATCTGGCTGACAGCTGACCTTGTCT
 AGGCCTGAGAAAGATGGGGCAGCCACTGGAATGGATGCCATCTGACGCCACCGTCTTGACCCCAAGCCCTGGACT
 CAACAGAGAGCAGCTGTACTGGGAGCTGAGCCAGCTGACCATGGCATCAAGAGCTGGGCCCTTACACCTGGACA
 GGAACAGTCTCTATGTCAATGGTTTCAACCATCGAGCTCTGTGGGCCCAACAGCACTCCTGGGACCTCCACAGT
 GACCTTGGGACCTCAGGGAATCCATCTCCTCCCTCCCAAGCCCAACAGCTGTTCTCTCCTGGTGGCGTTCACTT
 CAACCTTACCATCAACATCTGACATGAGGAGGACATGCGTCACTGGCTCCAGGAAGTTCAACACCAAGAGG
 GGTCTCTGAGGGTCTGCTTGGTCCCTGTTCAAGAACTCAGTGTGGCCCTCTGTAATCTGGCTGACAGCTGATCT
 TCTCTCAGGTCTGAGAAAGATGGGGCAGCCACTGGAGTGGATGCCATCTGACCCCAACAGCTTAAACCTCAAGGCC
 TGGACTGGACAGGAGCAGCTGTACTGGCAGCTGAGCCAGATGACCAATGGCATCAAGAGCTGGGCCCTTACACCT
 TGGACCGGAACAGTCTTACGTCAATGGTTTCAACCATCGAGCTCTGGGTCAACCAACAGCACTCTCTGGACTTCC
 ACAGTGTGACCTTGGAACTCAGGGAATCCATCCCGCTCCCAAGCCCAACAGCTGTGGCCCTCTCCTGGTGGCAT

Figura 1D

CACCCCTAACTTCACCATCACCACTGCAGTATGAGGAGGACATGCATCGCCCTGGATCTAGGAAGTTCAACGCCA
 CAGAGAGGGTCTGCAGGGTCTGCTTAGTCCCATATTCAAGAACTCCAGTGTGGCCCTCTGTACTCTGGCTGCAGA
 CTGACCTCTCTCAGGCCCGAGAAGGATGGGGCAGCACTGGAATGGATGCTGTCTGCCTCTACCACTTATCCCA
 AAGACCTGGGCTGGACAGAGAGCAGCTGTACTGGGAGCTAAGCCAGCTGACCCACAACATCACTGAGCTGGGCCCT
 ACAGCCTGGACAGGGACAGTCTCTATGTCAATGGTTTCACCCATCAGAACTCTGTGCCACCACAGTACTCTCTGGG
 ACCCTCCAGTGTACTGGGCAACCACTGGGACTCCATCCTCTTCCCGGCCACACAGAGCCTGGCCCTCTCTGTAT
 ACCATTCACTTTCAACTTTACCATCACCACTGCATTATGAGGAAAACATGCAACACCTGGTTCCAGGAAGTTCA
 ACACCAAGGAGAGGGTTCTGCAGGGTCTGCTCAAGCCCTTGTTCAGGAACACCACTGTGTGGCCCTCTGTACTCTGGC
 TGCAGACTGACCTTGTCTCAGACCTGAGAAGCAGGAGGCAGCCACTGGAGTGGACACCATCTGTACCCACCGGTTGA
 TCCCATCGGACCTGGACTGGACAGAGAGCGGCTATCTGGGAGCTGAGCCAGCTGACCAACAGCATCACAGAGCTGG
 GACCTTACACCTGGATAGGGACAGTCTCTATGTCAATGGCTTCAACCTTGGAGCTCTGTGCCAACACCAAGCACT
 CCTGGGACCTCCACAGTGCACCTGGCAACCTCTGGGACTCCATCTCCTCTGGCTGGCCACACAGCCCTGTCTCTCT
 CTGTATACCATTCACCTCAACTTTACCATCACCACTGCATTATGAGGAAAACATGCAACACCTGGTTCCAGGA
 AGTTCAACACCAAGAGAGGGTTCTGCAGGGTCTGCTCAAGCCCTTGTTCAGAGCACCAGCCTTGGCCCTCTGTAT
 TCTGGCTGCAGACTGACCTTGTCTCAGACCTGAGAAACATGGGGCAGCCACTGGAGTGGACGCCATCTGCACCTCTCG
 CCTGTATCCCACTGGTCTGGACTGGACAGAGAGCGGCTATCTGGGAGCTGAGCCAGCTGACCAACAGCGTTACAG
 AGCTGGGCCCTTACACCTTGGACAGGGACAGTCTCTATGTCAATGGCTTCAACCATCGGAGCTCTGTGCCAACCCAC
 AGTATTCTCTGGGACCTTCTGCAGTGCACCTGGAAACCTCTGGGACTCCAGCCTCCTCTCTGGCCACACAGCCCTGG
 CCCTCTCTGGTGGCACTTCAACCTCAACTTCACTATCACCAACCTGCAGTATGAGGAGGACATGCGTCAACCTGGTT
 CCAGGAAGTTCAACACCAAGAGAGAGTCTTGCAGGGTCTGCTCAAGCCCTTGTTCAGAGCACCAGTGTGGCCCT
 CTGTATCTGGCTGCAGACTGACCTTGTCTAGGCTGAAAGAGTGGGGCAGCCACCGGCTGGACACCATCTGCAC
 TCACCTCTGTGACCTCTAAACCTTGGACTGGACAGAGAGCAGTATCTGGGAGCTGAGCAACATGACCCGTGGCA
 TCATCGAGCTGGGCCCTTACCTCTGGACAGAGCAGTCTCTATGTCAATGGTTTCAACCATCGGAACTTGTGGCC
 ATCACCAAGCACTCTGGGACCTCCACAGTACACCTAGGAACCTCTGAACTCCATCCTCTCTACCTAGACCCATAGT
 GCTGGGCCCTCTCTGGTGGCATTCACCTCAACTTCAACATCACCACTTGCAGTATGAGGAGGCGCTGCAACCC
 CTGGCTCCAGGAAGTTCAATACCAAGGAGGGTCTTACAGGGTCTGCTCAGGCCCTTGTTCAGGAATACCAAGTATC
 GGCCCTCTGTATCTCAGCTGCAGACTGACCTTGTCTCAGGCCAGAGAGGACAGGCAGCCACCAAGTGTGATGCTAT
 CTGTACCCACCACTTGCACCTTCAAGCCCTGGACTGAAACAGAGAGCAGCTGTACTGGGAGCTGAGCCAGCTGACCC
 ACGGCATCACTGAGCTGGGCCCTTACACCTTGGACAGGGACAGTCTCTATGTGATGGTTTCACTCATTTGGAGGCC
 ATACCAACACCAAGCACTCTCTGGGACCTTCAATAGTGAACCTGGGAACCTTGGGATCCCACTTCTCTCTGAAAC
 TACAGCCACCGGCCCTCTCTGGTGGCATTCACACTCAACTTCAACATCACTAACCTACAGTATGAGGAGAACATGG
 GTCACCTCTGGCTCCAGGAAGTTCAACATCACAGAGAGTGTCTTGCAGGGTCTGCTCAAGCCCTTGTTCAGAGCACC
 AGTGTGGCCCTCTGTATCTTGGCTGCAGACTGACCTTGTCTCAGGCCCTGAGAAAGCAGAGTAGCCACCAAGATGGA
 CGCCATCTGCACCCACCGCCCTGACCCCAAAATCCTGGGCTAGACAGACAGCAGCTATCTGGGAGCTGAGCCAGC
 TGACCCACAGCATCACTGAGCTGGGACCTTACACCTTGGATAGGGACAGTCTCTATGTCAATGGTTTCAACCAAGCGG
 AGCTCTGTGGCCACCAACAGCACTCTCTGGGACTTTCACAGTACAGCCGGAACCTCTGAGACTCCATCATCTCTCTCC
 TGGCCACACAGCCACTGGCCCTGTCTCTGCTGCCATTCACCTCAATTTACCATCAATTAACCTGACAGTATGAGGAGG
 ACATGCACTGCCCCCTGGCTCCAGGAAGTTCAACACCAAGGAGGGTCTTTCAGGGTCTGCTTATGCCCTTGTTCAG
 AACACAGTGTGAGCTCTCTGTACTCTGGTTGCAGACTGACCTTGTCTCAGGCCCTGAGAAAGGATGGGGCAGCCACAG
 AGTGGATGCTGTCTGCACCATCTGCTCTGACCCCAAAAGCCCTGGACTGGACAGAGAGCGGCTGTACTGGAGCTGA
 GCCAGCTGACCCAGGATCACTGAGCTGGGCCCTTACACCTTGGACAGGACAGTCTCTATGTCAATGGTTTCAAC
 CATCAGAGCTCTATGACGACCAACAGAACTCTGTATCTCCCAATGCACTGGCAACCTGAGAACTCCAGCCCTC
 CCTGTCTGGACCTTACAGCCGCGAGCCCTCTCTGGTGTCTTACAAATTAACCTTCAACATCACTAACCTGCGGTATG
 AGGAGAACATGCATCACCTTGGCTCTGAGAAAGTTTAAACACCAAGGAGAGTCTTTCAGGGTCTGCTCAGGCCCTGTG
 TTTCAAGAACCAAGTGTGGCCCTCTGTACTCTGGCTGCAGACTGACCTTGTCTCAGGCCCAAGAAAGGATGGGGCAGC
 CACCAAGTGGATGCCATCTGCACCTACCGCCCTGATCCCAAAAGCCCTGGACTGGACAGAGAGCAGCTATCTGGG
 AGCTGAGCCAGCTAACCCACAGCATCACTGAGCTGGGCCCTTACACCTTGGACAGGGACAGTCTCTATGTCAATGGT
 TTTCAACAGCGGAGCTCTGTGCCCACTAGCATTTCTGGGACCCCAAGTGGACCTGGGAACATCTGGGACTCC
 AGTTTCTAAACCTGGTCCCTCGGCTGCCAGCCCTCTCTGGTGTCTTCACTCTCAACTTCAACATCACCAACCTGC
 GGTATGAGGAGAACATGCAGCACTCTGCTCCAGGAAGTTCAACACCAAGGAGGGTCTTTCAGGGCTGTCTCAGG
 TCCCTGTTCAAGAGCACAGTGTGGCCCTCTGTACTCTGGCTGCAGACTGACCTTGTCTCAGGCCCTGAAAGGATGG
 GACAGCCACTGGAGTGGATGCCATCTGCACCCACCACTGACCCCAAAAGCCCTAGGCTGGACAGAGAGCAGCTGT
 ATTGGGAGCTGAGCCAGCTGACCCACAATATCACTGAGCTGGGCCCTTATGCTGGACCAAGCAGCCCTCTTGTCT
 AATGGTTTCACTCATCGGAGCTCTGTGTCCACCAACAGCACTCTTGGGACCCCAAGTGTATCTGGGAGCATCTAA
 GACTCCAGCTCTGATATTGGCCCTTCACTGTCAGCATCTCTCTGATATCTTCAACCTCAACTTCAACATCACTA
 ACCTGCGGTATGAGGAGAACATGTGGCCCTGGCTCCAGGAAGTTTCAACATCAAGAGAGGGTCTTTCAGGGCTGTCTA
 AGGCCCTTGTTCAGGAACACCAAGTGTGGCCCTCTGTACTCTGGCTGCAGGCTGACCTTGTCTCAGGCCAGAGAAAGA
 TGGGGAAGCCACCGGAGTGGATGCCATCTGCACCCACCGCCCTGACCCACAGGCCCTGGGCTGGACAGAGAGCAGC
 GTTATTGGGAGCTGAGCCAGCTGACCCACAGCATCACTGAGCTGGGCCCTTACACACTGACAGGGACAGTCTCTAT
 GTCAATGGTTTCAACCATCGGAGCTCTGTACCCACCAAGCAGCAGCGGGTGGTCAAGGAGGACCATTCACACTGAA
 CTTCAACATCAACACCTTGGCTACATGGCGGACATGGGCCAACCGGCTCTCTCAAGTTCAACATCACAGACCAAG
 TCATGCAAGCACTGCTCAGTCTCTTGTTCAGAGGAGCAGCCTGGGTGACCGGTACAGGCTGACGGGTCTATCGCA
 CTAAGGTCTGTGAAGAACGGTGTGAGACACGGGTGGACCTCTCTGCACCTACCTGAGCCCTCTCAGCGGCCAGG
 TCTGCTATCAAGCAGGTGTTCATGAGCTGAGCCAGCAGACCATAGGCATCACCCGCTGGGCCCTTACTCTCTGG

Figura 1E

ACAAGACAGCCTCTACCTTAA CGGTTACAATGAACCTGGTCCAGATGAGCCTCCTACAACTCCCAAGCCAGCCACC
 ACATTCTGCTCCTCTGTGAGAAAGCCACAACAGCCATGGGGTACCACCTGAAGACCTCACACTCAACTTCACCAT
 CTCCAATCTCCAGTATTACCAAGATATGGGCAAGGGCTCAGCTACATTCAACTCCACCGAGGGGGTCTTTCAGCAAC
 TGCTCAGACCTTGTTCAGAAAGAGCAGCATGGGCCCTTCTACTTGGGTGCAACTGATCTCCCTCAGSCCTGAG
 AAGGATGGGGCAGCCACTGGTG TGGACACCACTGCACCTACCACTGACCTGTGGGCCCGGGCTGGACATACA
 GCAGCTTTACTGGGAGCTGAGTCACTGACCCATGGTGTACCCCACTGGGCTTCTATGTCTGGACAGGGATAGCC
 TCTTCATCAATGGCTATGCACCCAGAAATTTATCAATCCGGGGCGAGTACCAGATAAAATTTCCACATTGTCAACTGG
 AACCTCAGTAATCCAGACCCCACTCCTCAGAGTACATCACTCTGCTGAGGGACATCCAGGACAAGGTCAACCACT
 CTACAAAGGCAGTCAACTACATGACACATTCCGCTTCTGCTGGTCACTCACTTGACGATGGACTCCGTTGTGGTCA
 CTGTCAAGGCAGTGTCTCTCTCAATTTGGACCCAGCCTGGTGGAGCAAGTCTTTCTAGATAAGACCTGAAATGCC
 TCATTCCATTGGCTGGGCTCCACCTACAGTTGGTGGACATCCATGTGACAGAAATGGAGTCATCAGTTTATCAACC
 AACAGCAGCTCCAGCACCCAGCACTTCTACCTGAATTTCACTATCACTCACTACCATATTTCCAGGACAAAGCCC
 AGCCAGGCACCACTTACAGAGGAAACAAAGGAATTTGAGGATGCGCTCAACCACTCTTCCGAAACAGCAGC
 ATCAAGAGTTATTTTCTGACTGTCAAGTTTCAACATTCAAGGTCTGTCCCAACAGGCACCAACCGGGGTGGACTC
 CCTGTGTAACTTCTGCACTGGCTCGGAGAGTAGACAGAGTTGCCATCTATGAGGAATTTCTGCGGATGACCCGGA
 ATGGTACCCAGCTGAGAACTTCACTGGACAGGAGCAGTGTCTTGTGGATGGGTATTTCTCCCAACAGAAATGAG
 CCTTAACCTGGGAATTTGACCTTCCCTTCTGGGCTGTCTATCTCGGCTTGGCAGGACTCCTGGGACTCATCAC
 ATGCTGTATCTGCGGTGTCTGTGACCACTCGGCGGGGGAAGGAAGGAAGGAATACAACTCCAGCAACAGTGCC
 CAGGCTATACAGTCAACCTAGACCTGGAGGATCTGCAATGA CTGGAACCTTGCCGGTGCCTGGGGTGCCCTTTCC
 CCAGCCAGGGTCCAAGAGCTTGGCTGGGGCAGAAATAAACCATATTGGTGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAA

Figura 2A

PVTSLTLPGLVITTDGMGISREPGTSSSTNLSSSTSHRRL/TTLEDTVDEAMQPSTHTAVTNVRTSISGHESQSSVLS
DSETPKATSPMGTTTVMGETSVSISTSDFFETSRQIEPTSSLTSGLRETSSESSERISSATEGSTVLSVFPSSGATTEV
SRTEVISSRGTMSSGPDQPTISPDISTRAITRLSTSPIMTRSARSATITETGSPGATSEGTTLTLDSTTTTFMSGTHS
TASPGFSGHSEMTLMSRTPGDVPWPSLPSVEEASSVSSSLSSPANTSTSTFFSTLPESISSSPHPTALLTLGFPVKT
DMLRTSSSEPTSGPPNLSSSTSAHILATSEVTKDRKIHPSSENTPVNVGTVIYKHLSPSSVLADLVTTKTPSPMATT
STLGWTSVSTSTPAPPETMHTQPTSSLTSGLREISTSQETSSATERSASLSGMPTGATTKVSRTEALSGLRSTSTPGF
AQSTISPEISTETITRISTPLTTTGSARMTITPKTGHSGASSQGTFFLDTSSRASWPGTHSAATHRSFHSQWTTTMS
RGPEVDVSWPSRPSVEKTSPPSSLVLSAVTSPSPLYSTPSESSSSPLRVTSLETPVMKTTDMLDTSLEPVTSTSP
SNNIITDESILATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTISARQEFYSSYPGLPEPSKVTSPPVVTSTIKDIVSTTIPASS
BITRIEMESTSTLTFTPRETSTSQEIHSAKPTSTVPYKALTSATIEDSMTQVMSSSSRGSPDQSTMSQDISTEVI
LSTSPIKTESTEMTITQTGSPGATSRGTLTLDSTTTFMSTGTHSTASQGFSGHSEMTALMSRTPGEVFWLSHPSVVERA
SSASFSLSPPVMTSSSPVSSSTLPDSINSSSLPVTSLTSLGLVKTELLGTSSSEPTSSPENLSSSTAEILATTEVTT
DTEKLEMTNVVTSYGYTHSPSSVLADSVTTKATSSMGITYPTGDTNVLTSTPAFSDTSRIQTKSLSLTFLGMLMETS
ISEETSSATKSTVLSSVPTGATTEVSRTEAIGSSRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRKESDMMATPKTG
PSGATSGQTTFLDSSSTASWPGTHSATTQRFPRSVVITPMSRGPEVDVSWPSPLSVEKNSPPSSLVSSSSVTSPPSPLY
STPSSGSSHSSPVPVTLSTLFTSINMKATDMLDASLEPETTSAPNMNITDESILAAKATTETEAHVFPENTAAHSHVET
SATEELYSSESPGSEPTKVI SPVVTSSSIDNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPLGRETRTQDITSTSTSTV
LYKMPSGATPEVSRTEVMPSSRTSIPGPAQSTMSLDISDEVVTLSTSPIMTESAEITITQGYSLATSSQVTLPLG
TSMFTLFGTHSTMSQGLSHSEMTNLMRGPESLWTSRPFVETTRSSSSLTSLPLTSLSPVSSSTLSDSSPSSPLPV
TSLILPGLVKTLTLDSTSEPKTSSPNLSSSTVEIPATSEIMTDEKIHPSSENTAVAKVTSSESVHSHSSVLADS
ETITITIPSMGITSAVEDTIVFTSNPAFSETRRIPTREPTFSLTPGFRSTSEETTSITETSAVLPGVPTSAHTEVSM
TEIMSSNTHIPDSQSTMSPDITTEVITRLSSSSMMSESTQMTITQKSSPGATAQSTTLATTPAARHTSTV
PRFLHSEMTLMSRSPENPNKSSPVEKTSSSSSSLSLPVTSPSVSSSTLPQSI PSSSFVTSLLTPGMVKTTDTS
TEPGTSLSPNLSTSVILAASEVTITDEKIHPSSEMAVTVNGTSSGHELYSSVISHSEPKATTPVGTSSMAET
SISTSMANFETTGFAEPFSLTSGLRKTNMSLDTSSVTPNTFPSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSPPDWFPASQ
YTRIPVDIITFPFNASPTITESTGITSFPESRPTMSVTSTHLLSTDLPSAETISTGTVMPSLSSEAMTSFATTGVP
AISGSGSPFSTESGPGDALTSTIAESLPSSTFPVPSSTFTTDSSTIPALHEITSSSATPYRVVTSSTLSTGTSST
GRLVMVSTLDTSSQPGRTSSSPILDRMTESVELGVTSAVQVPSLSTRLTRTDGIMHEITKIPNEAAHROGIRPVK
GPQTSFSPASPGHHTGGTKRMTTITALKTTTALKTTSRATLTSSVYPTLGLTLPINASMQMASTIPTEMMITT
PYVFPVPEPTSSSLATSLGAETSTALPRTTPSVFNRSEETASLVRSRGAERSFVIQTLDVSSSEEDTASVNIH
BETIPVTEKTPNFHSELDTVSSTATSHGADVSSAIPNISPSELDALTPLVITSGTDTSTTFTPLTKSPHETRT
TWLTHPAETSSSTIPRTIPNPSKHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEADLVTSQVTSSTGTDNRMTIPTL
PGEKTIASLVTHPRAQTSSAIPSTISPAVSRVLSMVTSLAAKTSSTNRALTNSPGEFATTVSLVTHSAQTSPTV
PWTTISIFHRSKSDTTPSMITSHGAESSSAVPTTVEVPGVVTPLVTSRAVISTITIPILTSPOEPETTPSMATS
HGERASSAIPPTTVSPGVPGVVTSLVTSRAVTSITIPILTFSLGEPETTPSMATSHGTAGSAVPTVLEPVGMT
SLVASSRAVTSSTLPLTLSPGEPETTPSMATSHGAEASSTVPTVSPVPGVVTSLVTSSSGVNSTSIPTLILSPGE
LETTPSMATSHGAEASSAVPTTVSPGVSGVVTPLVTSRAVTSITIPILTLSSSEPETTPSMATSHGAEASSAVLT
VSPVPGMVTFVTSRAVTSITIPILTLSSDEPETTSLVTHSEAKMIGAIPTLGVSPVQGLVTSVLTSSGSET
AFSNLTVAASSQPETIDSWAHGTEASSVPTLTVSTGEPTNISLVTHPAESSSTLPRTRFSHSELDTMPSTVT
SPEARESSAISTTISPGIPGVLTSLVTSGRDISATFTVPSPHSEATASWVTHPAVTSSTVPTTPNYSHSEPD
TTPSIATSPGAETSDPPTITVSPDVPDMVTQVTSSTGTDTSITIPILTLSSGEPETTSFITYSETHTSAPILP
VSPDASKMLTSLVSSGTDSTTTPFLTETFPYEPETTAIQLIHPAETNTMVPTTPKFSHKSDDTLFVAITSPGPE
ASSAVSTTITSPDMSDLVTSVLPSSGTDSTTTPFLSTFPYEPETTATWLTNPARTSTTVSGTIPNFSHRGSDTAPS
MVTSPGVDTSRGVPFTTIPPSIPGVVTSQVTSATDTSITIPILTPSPGEPETTPASSATHPGTGTFTVPIRTVPS
EPDTMASWVTHPPQSTTPVSRSTTSFSSHSSPDATPVNATSPRTEASSAVLTITSPGAPEMVTSTQITSSGAATSTTV
TLTHSPGMPETTALLSTHPTSTSTKTPASTVFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTSSSLFTLLVGTSTSRVDLS
PTASPGVSAKTAPLSTHPTSTSTMIPTSTLSLGLLETTGLLATSSSAETSTSTLTLTVSPAVSGLSSAISTTDKQ
TVTSWNTETSPSVTSVGGPEFSTRTVGTMTLIPSENPPTPKTSHGEGVSTTILRTTMVEATNLATGSSPTVAKT
TTTPTNLAGSLFTPLITPGMSTLASEVTSRTSYNHRSWISTSSYNKRYWTPATSTPTVSTFPSTGISTSSIPSTA
ATVPFHVFPFTLNFTITNLQYEDMRHPGSRKFNATERELQGLLKPLFRNSSLLEYLYSGCRLASLRPEKDSATAVDA
ICTHRPDPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPS
PTTAGPILLMPFTLNFTITNLQYEDMRRTGSRKFNMTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLRLPEKDGAAATGV
DAICTHRLDPKSPGLNREQLYWELSKLTNDIEELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVSTSTSTPGTSTVDLRTSGTPSSL
SSPTIMAGPPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMHPGSRKFNTERVLQGLLGPFIKNTSVGPLYSGCRLTLRLSEKDG
ATGVDAICTHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRTSVPTTSTPGTSTVDLRTSGT
PFLSPATAGPPLLVPFTLNFTITNLQYEDMRHPGSRKFNTERVLQGLLGPFIKNTSVGPLYSGCRLTLRLSEKDG
GAATGVDAICTHRLDPKSPGVDRQYLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSTPGTSTVDLGS
TPSSLPSTSATAGPPLLVPFTLNFTITNLQYEDMRHPGSRKFNTERVLQGLLGPFIKNTSVGPLYSGCRLTLRLS
EKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDRQYLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNTSTPGTSTVDL
GTSSTPSSLSPSTAGPPLLVPFTLNFTITNLQYEDMRHPGSRKFNTERVLQGLLGPFIKNTSVGPLYSGCRLTLRL
RPEKNGAATGMDAICTHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSVAPTSTPGTSTV
DLGTSSTPSSLSPSTAGPPLLVPFTLNFTITNLQYEDMRHPGSRKFNTERVLQGLLGPFIKNTSVGPLYSGCRLI
SLRSEKGAATGVDAICTHRLNPOSPGLDREQLYQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSGLTSTPTWTS

Figura 2B

TVDLGTSCTPSVPVSPPTTAGPLLVFFTLNFTITNLQYEEEDMHRPGSRKFNATERVLQGLLSPIFKNSSVGPLYSGCR
 LTLRLPEKDGAAATGMDAVCLYHPNPKRPGLDREQLYWELSQLTHNITELGPYSLDRDSLYVNGFTHQNSVPTTSTFG
 TSTVYWATTGTPSSFPGHTEPGPLLIPTTFNFTITNLHYEENMQHPGSRKFNTERVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSG
 CRLTLRLPEKQEAATGVDITCTHRVDP1GPGLDRERLYWELSQLTNSITELGPYTLDRDSLYVNGFNFWSSVPTTST
 FGTSTVHLATSGTPSSLPGHATAPVPLLIPTTLNFTITNLHYEENMQHPGSRKFNTERVLQGLLKPLFKNTSVGPLY
 SGCRLTLRLPEKHGAATGVDAICTLRLDPTGPGLDREQLYWELSQLTNSVTELGPHYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTT
 SIPGTSVAVHLETSGTPASLPGHATAPGPLLVFFTLNFTITNLQYEEEDMHRPGSRKFNTERVLQGLLKPLFKNTSVGP
 LYSGCRLTLRLPEKRGAAATGVDITCTHRLDPLNPGLDREQLYWELSQLTRGIIELGPYLLDRGSLYVNGFTHRNFVP
 ITSTPGTSTVHLGTSPTSSLPFRPIVPGPLLVFFTLNFTITNLQYEEAMRHGPGSRKFNTERVLQGLLKPLFKNTSI
 GPLYSSCRLTLRLPEKDKAAATRVDAICTHNPDPQSPGLNREQLYWELSQLTHGITELGPYTLDRDSLYVDGFTHNSP
 IPTTSTPGTSIVNLGTSGIPPSLPETTATGPLLVFFTLNFTITNLQYEEENMGHPGSRKFNITESVLQGLLKPLFKST
 SVGPLYSGCRLTLRLPEKDGATRVDAICTHRPDPKI PGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTQR
 SSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPATGTVLLFFTLNFTITNLQYEEEDMHRPGSRKFNTERVLQGLLMPLFK
 NTSVSSLYSGCRLTLRLPEKDGAAATRVDAICTHRPDPKSPGLDRERLYWELSQLTHGITELGPYTLDRDSLYVNGFT
 HQSMTTTTPTDSTMHATSRTPASLSGPTTASPLLVFTINFTITNLRYEENMGHPGSRKFNTERVLQGLLRFPV
 FKNTSVGPLYSGCRLTLRLPKDGAATKVDAICTYRPDPKSPGLDRERLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNG
 FTQRSSVPTTSTIPGTFTVLDGTSCTFVSKPGPSAASPLLVFTLNFTITNLRYEENMGHPGSRKFNTERVLQGLLR
 SLFKNTSVGPLYSGCRLTLRLPEKDGATGVDAICTHHPDPKSPRLDRERLYWELSQLTHNITELGPYALDNDLSFV
 NGFTHRSSSVSTTSTPGTFTVYLGASKTPASIFGFSAAHLLILFTLNFTITNLRYEENMGHPGSRKFNTERVLQGLL
 RPLFKNTSVGPLYSGCRLTLRLPEKDGATGVDAICTHRPDPGPGLDREQLYELSQLTHSITELGPYTLDRDSLY
 VNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTITNLRYMADMGQPGSLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGCRVIA
 LRSVKNGAETRVDLLCTYLQPLSGPLFIKQVFHELSQLTHGITRLGPYSLDKDSLYLNGYNEPGPDEPPTPKPAT
 TFLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTITNLQYSPDMGKGSATFNTSTEGVLQHLRLPLFKSSMGPFYLGQCQLISLRPE
 KDGAATGVDITCTYHPDPVPGGLDIQQLYWELSQLTHGVTQLGFYVLDRLSLFINGYAPQNLISIRGEYQINPHIVNW
 NLSNPDPSTSEYITLLRDIQDKVTTLYKGSQQLHDTFRFCLVTNLTMDSVLVTVKALPSSNLDPSLVEQVFLDKTLNA
 SFHNLGSTYQLVDIHNVTENESSVYQPTSSSTQHLYLNFTITNLPIYSQDKAQFGTTNYQRNKNIEDALNQLFRNSS
 IKSYPBDCQVSTFRVFNRRHTGVDSLCNFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNTFLDRSSSVLDGYSFHRNE
 PLTGNSDLPFMAVILIGLAGLGLITCLICGVLVTTTRRRKKEGNYVQQQCPGYQSHLDLEDLQ

Secuencia de repetición de mucina:

5 Aminoácidos 3765-6397

Figura 3

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
mul1D10-L	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	L	G	E	R	V	T	M	T	C
11D10-graft	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
Kabat#	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
huKI	R	A	S	Q							S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
mul1D10-L	T	A	S	S	S						V	S	S	S	Y	L	H	W	Y	Q	Q	K	P
11D10-graft	T	A	S	S	S	S					V	S	S	S	Y	L	H	W	Y	Q	Q	K	P
Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
huKI	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S
mul1D10-L	G	S	S	P	K	L	W	I	Y	S	T	S	N	L	A	S	G	V	P	G	R	F	S
11D10-graft	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	T	S	N	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S
Kabat#	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
huKI	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
mul1D10-L	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M	E	A	E	D	A	A	T	Y
11D10-graft	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
Kabat#	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	
huKI	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:3)
mul1D10-L	Y	C	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:4)
11D10-graft	Y	C	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:5)

Figura 4

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
mul1D10-H	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	S
11D10-graft	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
Kabat#	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
hum III	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S		W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S
mul1D10-H	G	F	N	I	K	D	T	Y	M	H		W	V	K	Q	R	P	E	Q	G	L	E	W	I	G
11D10-graft	G	F	N	I	K	D	T	Y	M	H		W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G
Kabat#	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
hum III	V	I	S	G			D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R
mul1D10-H	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	K	A	T	L	T	A
11D10-graft	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	R	F	T	I	S	A
Kabat#	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
hum III	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
mul1D10-H	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	F	C	V
11D10-graft	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	V
Kabat#	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
hum III	R	G										F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S (SEQ
ID NO:6)																									
mul1D10-H	R	D	Y	Y	G	H	T	Y	G			F	A	F	C	D	Q	G	T	T	L	T	V	S	A (SEQ
ID NO:7)																									
11D10-graft	R	D	Y	Y	G	H	T	Y	G			F	A	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S (SEQ
ID NO:8)																									

Figura 5

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
mu3A5-L	D	I	Q	M	T	Q	S	S	S	F	L	S	V	S	L	G	G	R	V	T	I	T	C
3A5-graft	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
Kabat#	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
huKI	R	A	S	Q							S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
mu3A5-L	K	A	S	D	L						I	H	N	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	
3A5-graft	K	A	S	D	L						I	H	N	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	
Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
huKI	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S
mu3A5-L	G	N	A	P	R	L	L	I	S	G	A	T	S	L	E	T	G	V	P	S	R	F	S
3A5-graft	G	K	A	P	K	L	L	I	S	G	A	T	S	L	E	T	G	V	P	S	R	F	S
Kabat#	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
huKI	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
mu3A5-L	G	S	G	S	G	N	D	Y	T	L	S	I	A	S	L	Q	T	E	D	A	A	T	Y
3A5-graft	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
Kabat#	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	
huKI	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:3)
mu3A5-L	Y	C	Q	Q	Y	W	T	T	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K		(SEQ ID NO:9)
3A5-graft	Y	C	Q	Q	Y	W	T	T	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:10)

Figura 6A

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
hum III mu3A5-H 3A5.L-graft 3A5.F-graft	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
	D	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	N	P	S	Q	S	L	S	L	T	C	T	V	T
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
Kabat#	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
hum III mu3A5-H 3A5.L-graft 3A5.F-graft	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	
	G	Y	S	I	T	N	D	Y	A	W	N	W	I	R	Q	F	P	G	N	K	L	E	W	M	G
	G	Y	S	I	T	N	D	Y	A	W	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G
	G	Y	S	I	T	N	D	Y	A	W	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G
Kabat#	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
hum III mu3A5-H 3A5.L-graft 3A5.F-graft	V	I	S	G			D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R
	Y	I	N	Y				S	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	R	I	S	I	T	R
	Y	I	N	Y				S	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	R	F	T	I	S	R
	Y	I	N	Y				S	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	R	F	T	I	S	R
Kabat#	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
hum III mu3A5-H 3A5.L-graft 3A5.F-graft	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
	D	T	S	K	N	Q	F	F	L	H	L	N	S	V	T	T	E	D	T	A	T	Y	Y	C	A
	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
	D	N	S	K	N	T	F	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A

Figura 6B

Kabat#	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
hum III ID NO:6)	R	G										F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S (SEQ
mu3A5-H ID NO:11)	R	W	D	G	G							L	T	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A (SEQ
3A5.L-graft ID NO:12)	R	W	D	G	G							L	T	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S (SEQ
3A5.F-graft ID NO:13)	R	W	D	G	G							L	T	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S (SEQ

Figura 7

Kabat#	24	25	26	27	A	28	29	30	31	32	33	34	
T	A	S	S	S	S	V	S	S	S	Y	L	H	(SEQ ID NO:14)
T	Q	R	T	S	R	V	K	R	S	Y	I	S	(SEQ ID NO:15)
T	P	R	G	R	V	V	R	S	S	Y	L	S	(SEQ ID NO:16)
P	E	C	X	S	S	L	G	T	I	Y	L	H	(SEQ ID NO:17)
S	A	S	S	S	S	V	N	S	T	Y	L	H	(SEQ ID NO:18)
T	A	S	T	A	V	G	S	S	S	Y	L	H	(SEQ ID NO:19)
N		S	R	S	V	S	T	R	Y	L	H	H	(SEQ ID NO:20)
N	T	T	R	S	V	S	T	G	Y	L	H	H	(SEQ ID NO:21)
T	A	S	S	R	V	T	S	T	Y	L	H	H	(SEQ ID NO:22)
N	T	P	T	G	V	N	P	V	Y	L	H	H	(SEQ ID NO:23)
A	A	S	S	D	V	I	G	S	Y	V	H	H	(SEQ ID NO:24)
G	L	S	T	S	V	N	S	S	Y	M	H	H	(SEQ ID NO:25)
N	A	K	S	G	V	R	S	S	X	V	H	H	(SEQ ID NO:26)
N	S	N	G	S	V	S	S	K	Y	I	H	H	(SEQ ID NO:27)
T	P	S	R	I	V	S	G	S	Y	L	S	S	(SEQ ID NO:28)
N	P	S	R	R	V	T	G	H	Y	V	S	S	(SEQ ID NO:29)
T	S	S	S	A	V	S	G	S	Y	V	S	S	(SEQ ID NO:30)
T	S	T	T	I	V	R	G	R	Y	Y	S	S	(SEQ ID NO:31)
T	A	S	S	T	L	S	S	N	Y	L	T	S	(SEQ ID NO:32)
T	P	T	G	S	I	S	R	R	Y	L	S	S	(SEQ ID NO:33)
T	A	G	S	K	A	N	S	S	Y	I	H	H	(SEQ ID NO:34)

Figura 8

Kabat#	49	50	51	52	53	54	55	56	
Y	S	T	S	N	L	A	S	(SEQ ID NO:35)	
Y	S	T	S	H	F	A	S	(SEQ ID NO:36)	
Y	S	A	S	N	V	P	S	(SEQ ID NO:37)	
Y	S	T	I	N	L	A	T	(SEQ ID NO:38)	
Y	S	T	S	K	V	A	N	(SEQ ID NO:39)	
Y	S	T	T	N	L	A	S	(SEQ ID NO:40)	
Y	S	T	N	H	L	A	S	(SEQ ID NO:41)	
Y	S	T	N	N	L	A	S	(SEQ ID NO:42)	
Y	S	T	I	H	P	A	S	(SEQ ID NO:43)	
Y	S	T	S	H	L	S	Y	(SEQ ID NO:44)	
Y	S	T	R	T	M	A	S	(SEQ ID NO:45)	
Y	S	T	S	X	L	F	S	(SEQ ID NO:46)	
Y	N	T	S	N	R	A	S	(SEQ ID NO:47)	
Y	G	T	S	H	L	A	S	(SEQ ID NO:48)	
Y	G	T	G	S	P	A	S	(SEQ ID NO:49)	
Y	S	T	N	K	L	A	R	(SEQ ID NO:50)	
Y	S	T	S	Q	L	G	R	(SEQ ID NO:51)	
Y	S	T	S	N	V	P	Q	(SEQ ID NO:52)	
Y	G	T	Y	N	L	P	I	(SEQ ID NO:53)	
Y	G	S	N	N	R	A	Y	(SEQ ID NO:54)	
Y	S	S	S	N	T	X	S	(SEQ ID NO:55)	
Y	S	A	N	K	L	A	S	(SEQ ID NO:56)	
Y	S	A	T	R	R	A	S	(SEQ ID NO:57)	
Y	S	A	S	N	R	A	R	(SEQ ID NO:58)	

Figura 9

Kabat#	89	90	91	92	93	94	95	96	97	
	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	T	(SEQ ID NO:59)
	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	K	(SEQ ID NO:60)
	H	Q	Y	H	R	T	P	Y	K	(SEQ ID NO:61)
	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	G	(SEQ ID NO:62)
	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	N	(SEQ ID NO:63)
	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	S	(SEQ ID NO:64)
	H	Q	Y	Y	R	S	P	Y	T	(SEQ ID NO:65)
	H	Q	Y	Y	R	T	P	Y	S	(SEQ ID NO:66)
	H	Q	Y	Q	R	S	P	Y	T	(SEQ ID NO:67)
	H	Q	Y	Q	R	S	P	Y	R	(SEQ ID NO:68)
	H	Q	Y	N	R	S	P	Y	A	(SEQ ID NO:69)
	H	Q	Y	H	R	T	P	Y	T	(SEQ ID NO:70)
	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	I	(SEQ ID NO:71)
	H	Q	Y	H	R	R	P	Y	R	(SEQ ID NO:72)
	H	Q	Y	H	R	N	P	Y	I	(SEQ ID NO:73)

Figura 10

Kabat#	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A
G	F	N	I	K	D	T	Y	M	H		(SEQ ID NO:74)
A	F	N	I	A	D	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:75)
R	F	R	I	K	D	T	Y	V	H		(SEQ ID NO:76)
R	F	N	I	K	D	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:77)
S	F	Q	I	N	D	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:78)
S	F	Q	M	S	D	T	Y	V	H		(SEQ ID NO:79)
D	F	N	I	K	D	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:80)
G	F	N	I	I	D	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:81)
G	L	Q	I	V	D	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:82)
G	F	N	I	K	D	T	Y	L	H		(SEQ ID NO:83)
G	F	N	I	Q	D	L	Y	L	H		(SEQ ID NO:84)
G	F	N	I	I	D	T	Y	M	H		(SEQ ID NO:85)
G	W	K	M	T	D	T	Y	M	H		(SEQ ID NO:86)
E	F	K	I	K	D	T	Y	V	H		(SEQ ID NO:87)
G	F	N	I	K	D	T	Y	V	H		(SEQ ID NO:88)
G	F	Y	I	S	N	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:89)
G	F	N	I	K	N	T	Y	L	H		(SEQ ID NO:90)
G	F	S	I	E	N	T	Y	M	H		(SEQ ID NO:91)
G	F	N	I	K	N	T	Y	M	H		(SEQ ID NO:92)
D	F	K	I	E	N	T	Y	V	H		(SEQ ID NO:93)

Figura 11

Kabat#	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
ID NO:94)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	(SEQ
ID NO:95)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	S	D	P	K	V	R	G	(SEQ
ID NO:96)	G	R	V	D	P			A	N	G	L	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	(SEQ
ID NO:97)	G	R	V	D	P			A	N	G	E	I	K	S	H	P	I	F	Q	G	(SEQ
ID NO:98)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	E	D	R	Q	F	Q	G	(SEQ
ID NO:99)	G	R	V	D	P			E	Y	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	(SEQ
ID NO:100)	G	R	L	D	P			A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	(SEQ
ID NO:101)	G	R	V	D	P			A	N	G	D	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	(SEQ
ID NO:102)	G	R	V	D	P			A	N	G	K	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	(SEQ
ID NO:103)	G	R	V	D	P			A	N	G	L	T	K	Y	N	P	K	F	Q	G	(SEQ
ID NO:104)	G	R	V	D	P			A	N	G	Y	T	K	Y	N	P	K	F	Q	G	(SEQ
ID NO:105)	G	R	V	D	P			A	N	G	Y	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	(SEQ
ID NO:106)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	Y	K	Y	D	P	K	F	Q	G	(SEQ
ID NO:107)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	S	K	Y	D	P	K	F	Q	G	(SEQ
ID NO:108)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	Y	D	H	R	F	Q	G	(SEQ
ID NO:109)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	R	G	(SEQ
ID NO:110)	G	R	V	D	P			S	N	G	N	T	K	S	D	G	K	F	N	G	(SEQ
ID NO:111)	G	R	V	D	P			V	D	G	K	T	K	Y	N	P	Q	I	Q	G	(SEQ
ID NO:112)	G	R	V	D	P			A	H	G	N	I	K	Y	D	P	Q	I	M	G	(SEQ

Figura 12

Kabat#	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	101	102	
ID NO:113)	V	R	D	Y	Y	G	H	T	Y	G			F	A	F	(SEQ
ID NO:114)	V	R	D	Y	Y	G	H	T	Y	G			F	Q	P	(SEQ
ID NO:115)	A	R	D	N	Y	G	H	T	Y	G			F	G	F	(SEQ
ID NO:116)	V	R	D	T	Y	G	H	T	Y	G			F	A	Y	(SEQ
ID NO:117)	V	R	D	Y	Y	G	H	T	Y	G			F	G	Y	(SEQ
ID NO:118)	V	R	D	Y	Y	G	H	T	Y	G			F	G	V	(SEQ

Figura 13

Kabat#	24	25	26	27	A	28	29	30	31	32	33	34	
	K	A	S	D	L		I	H	N	W	L	A	(SEQ ID NO:119)

Figura 14

Kabat#	49	50	51	52	53	54	55	56	
	S	G	A	T	S	L	E	T	(SEQ ID NO:120)
.	Y	G	A	T	S	L	E	T	(SEQ ID NO:121)

Figura 15

Kabat#	89	90	91	92	93	94	95	96	97	
	Q	Q	Y	W	T	T	P	F	T	(SEQ ID NO:122)

Figura 16

Kabat#	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A
	G	Y	S	I	T	N	D	Y	A	W	N (SEQ ID NO:123)

Figura 17

Kabat#	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
ID NO:124)	G	Y	I	N	Y			S	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	(SEQ
ID NO:125)	G	Y	I	S	Y			S	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	(SEQ
ID NO:126)	G	Y	I	N	Y			A	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	(SEQ
ID NO:127)	G	Y	I	S	Y			A	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	(SEQ

Figura 18A

Kabat#	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	101	102
ID NO:128)	A	R	W	D	G	G							L	T	Y (SEQ
ID NO:129)	A	R	W	A	A	G							L	T	N (SEQ
ID NO:130)	A	R	W	D	A	G							L	S	Y (SEQ
ID NO:131)	A	R	W	D	A	G							L	T	Y (SEQ
ID NO:132)	A	R	W	E	A	G							L	N	H (SEQ
ID NO:133)	A	R	W	E	A	G							L	N	Y (SEQ
ID NO:134)	A	R	W	M	A	G							L	S	D (SEQ
ID NO:135)	A	R	W	S	A	G							L	D	H (SEQ
ID NO:136)	A	R	W	T	A	G							L	D	Y (SEQ
ID NO:137)	A	R	W	T	A	G							L	T	H (SEQ
ID NO:138)	A	R	W	V	A	G							L	T	N (SEQ
ID NO:139)	A	R	W	A	G	G							L	E	N (SEQ
ID NO:140)	A	R	W	D	G	G							L	S	Y (SEQ
ID NO:141)	A	R	W	D	R	G							L	T	Y (SEQ
ID NO:142)	A	R	W	A	S	G							L	S	H (SEQ
ID NO:143)	A	R	W	A	S	G							L	S	N (SEQ
ID NO:144)	A	R	W	A	S	G							L	S	Y (SEQ
ID NO:145)	A	R	W	A	S	G							L	T	H (SEQ
ID NO:146)	A	R	W	A	S	G							L	T	N (SEQ
ID NO:147)	A	R	W	D	S	G							L	K	Y (SEQ
ID NO:148)	A	R	W	D	S	G							L	N	Y (SEQ
ID NO:149)	A	R	W	D	S	G							L	S	S (SEQ
ID NO:150)	A	R	W	D	S	G							L	S	V (SEQ
ID NO:151)	A	R	W	D	S	G							L	S	Y (SEQ
ID NO:152)	A	R	W	D	S	G							L	T	Y (SEQ
ID NO:153)	A	R	W	E	S	G							L	S	H (SEQ
ID NO:154)	A	R	W	E	S	G							L	S	V (SEQ
ID NO:155)	A	R	W	K	S	G							L	D	S (SEQ

Figura 18B

Kabat#	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	101	102
ID NO:156)	A	R	W	K	S	G							L	E	Y (SEQ
ID NO:157)	A	R	W	L	S	G							L	D	F (SEQ
ID NO:158)	A	R	W	L	S	G							L	D	S (SEQ
ID NO:159)	A	R	W	L	S	G							L	E	S (SEQ
ID NO:160)	A	R	W	L	S	G							L	S	D (SEQ
ID NO:161)	A	R	W	R	S	G							L	E	H (SEQ
ID NO:162)	A	R	W	S	S	G							L	N	Y (SEQ
ID NO:163)	A	R	W	S	S	G							L	T	Y (SEQ
ID NO:164)	A	R	W	T	S	G							M	D	S (SEQ
ID NO:165)	A	R	W	T	S	G							L	T	Y (SEQ
ID NO:166)	A	R	W	D	T	G							L	T	Y (SEQ
ID NO:167)	A	R	W	A	A	G							L	D	H (SEQ
ID NO:168)	A	R	W	A	A	G							L	D	S (SEQ
ID NO:169)	A	R	W	L	A	G							L	S	N (SEQ
ID NO:170)	A	R	W	T	A	G							L	D	Q (SEQ
ID NO:171)	A	R	W	A	S	G							L	D	H (SEQ
ID NO:172)	A	R	W	A	S	G							L	D	N (SEQ
ID NO:173)	A	R	W	A	S	G							L	D	S (SEQ
ID NO:174)	A	R	W	A	S	G							L	D	Y (SEQ
ID NO:175)	A	R	W	K	S	G							L	D	T (SEQ
ID NO:176)	A	R	W	K	S	G							L	G	P (SEQ
ID NO:177)	A	R	W	M	S	G							L	D	S (SEQ
ID NO:178)	A	R	W	R	S	G							L	E	S (SEQ
ID NO:179)	A	R	W	R	S	G							L	E	Y (SEQ
ID NO:180)	A	R	W	T	S	G							L	D	S (SEQ
ID NO:181)	A	R	W	T	S	G							L	D	T (SEQ
ID NO:182)	A	R	W	T	S	G							L	D	V (SEQ
ID NO:183)	A	R	W	T	S	G							L	D	Y (SEQ

Figura 19

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T
 [-H1-] W V R Q A P G Q G L E W M G [-H2-] R V T I T A D T S T S
 T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R [-H3-] W G Q G T L V T
 V S S (SEQ ID NO:184)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S [-H1-] W V R Q
 A P G Q G L E W M [-H2-] R V T I T A D T S T S T A Y M E L S S L
 R S E D T A V Y Y C A R [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID
 NO:185)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S [-H1-] W V R Q
 A P G Q G L E W M [-H2-] R V T I T A D T S T S T A Y M E L S S L
 R S E D T A V Y Y C A [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID
 NO:186)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S [-H1-] W V R Q
 A P G Q G L E W M [-H2-] R V T I T A D T S T S T A Y M E L S S L
 R S E D T A V Y Y C [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID
 NO:187)

Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S G G S V S
 [-H1-] W I R Q P P G K G L E W I G [-H2-] R V T I S V D T S K N
 Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R [-H3-] W G Q G T L V T
 V S S (SEQ ID NO:188)

Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S [-H1-] W I R Q
 P P G K G L E W I [-H2-] R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V
 T A A D T A V Y Y C A R [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID
 NO:189)

Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S [-H1-] W I R Q
 P P G K G L E W I [-H2-] R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V
 T A A D T A V Y Y C A [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID
 NO:190)

Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S [-H1-] W I R Q
 P P G K G L E W I [-H2-] R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V
 T A A D T A V Y Y C [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID
 NO:191)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S [-H1-] W V R Q
 A P G K G L E W V [-H2-] R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L
 R A E D T A V Y Y C [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID
 NO:192)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S [-H1-] W V R Q
 A P G K G L E W V [-H2-] R F T I S R D N S K N T F Y L Q M N S L
 R A E D T A V Y Y C [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID
 NO:193)

Figura 20

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C [-L1-] W Y Q Q K P
G K A P K L L I [-L2-] G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S
L Q P E D F A T Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K R (SEQ ID
NO:194)

D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C [-L1-] W Y L Q K P
G Q S P Q L L I Y [-L2-] G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
R V E A E D V G V Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K (SEQ ID
NO:195)

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C [-L1-] W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y [-L2-] G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S
R L E P E D F A V Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K (SEQ ID
NO:196)

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C [-L1-] W Y Q Q K P
G Q P P K L L I Y [-L2-] G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S
S L Q A E D V A V Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K (SEQ ID
NO:197)

Figura 21A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND
YAWNWVRQAPGKGLEWVGYNINYSGYTTYNPSL
KSRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARWASGLDYWGQGDTLVTVSS (SEQ ID NO:198)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND
YAWNWVRQAPGKGLEWVGYNINYSGYTTYNPSL
KSRFTISRDTSKNTFYLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARWASGLSHWGQGDTLVTVSS (SEQ ID NO:199)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND
YAWNWVRQAPGKGLEWVGYNINYSGYTTYNPSL
KSRFTISRDTSKNTFYLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARWASGLSYWGQGDTLVTVSS (SEQ ID NO:200)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND
YAWNWVRQAPGKGLEWVGYNINYSGYTTYNPSL
KSRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARWTSGLDYWGQGDTLVTVSS (SEQ ID NO:201)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND
YAWNWVRQAPGKGLEWVGYNINYSGYTTYNPSL
KSRFTISRDTSKNTFYLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARWDAGLTYWGQGDTLVTVSS (SEQ ID NO:202)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND
YAWNWVRQAPGKGLEWVGYNINYSGYTTYNPSL
KSRFTISRDTSKNTFYLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARWDSGLTYWGQGDTLVTVSS (SEQ ID NO:203)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND
YAWNWVRQAPGKGLEWVGYNINYSGYTTYNPSL
KSRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARWKSGLDSDWGQGDTLVTVSS (SEQ ID NO:204)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND
YAWNWVRQAPGKGLEWVGYNINYSGYTTYNPSL
KSRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARWTSGLDSDWGQGDTLVTVSS (SEQ ID NO:205)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND
YAWNWVRQAPGKGLEWVGYSISYSGYTTYNPSL
KSRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARWASGLDYWGQGDTLVTVSS (SEQ ID NO:206)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND
YAWNWVRQAPGKGLEWVGYNINYAGYTTYNPSL
KSRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARWASGLDYWGQGDTLVTVSS (SEQ ID NO:207)

Figura 21B

```

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y S I T N D
Y A W N W V R Q A P G K G L E W V G Y I S Y S G Y T T Y N P S L
K S R F T I S R D T S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
A R W T S G L D Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:208)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y S I T N D
Y A W N W V R Q A P G K G L E W V G Y I N Y A G Y T T Y N P S L
K S R F T I S R D T S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
A R W T S G L D Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:209)

```

Figura 22

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S D L I H N W
 L A W Y Q Q K P G K A P K L L I S G A T S L E T G V P S R F S G
 S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y W T T P F
 T F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO:210)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S D L I H N W
 L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y G A T S L E T G V P S R F S G
 S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y W T T P F
 T F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO:211)

Figura 23

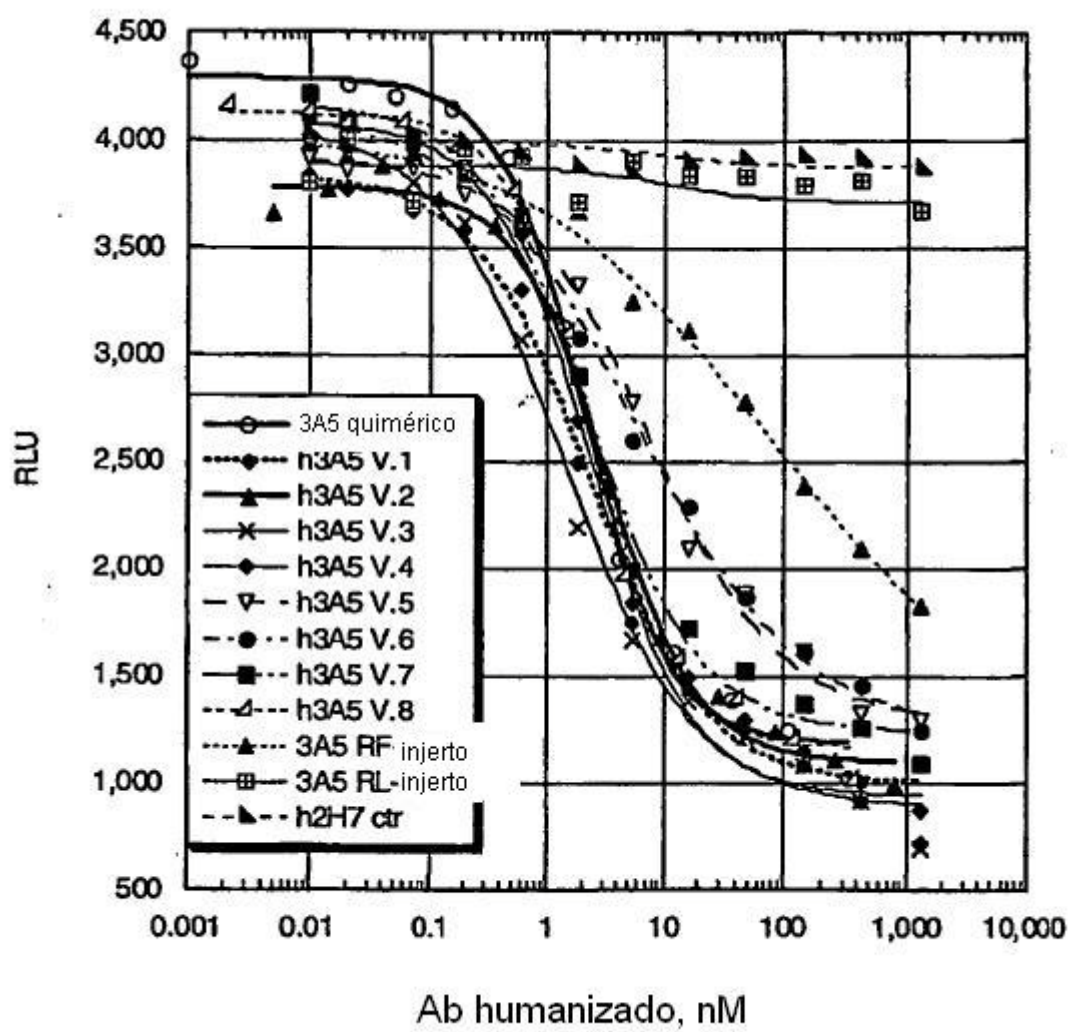


Figura 24

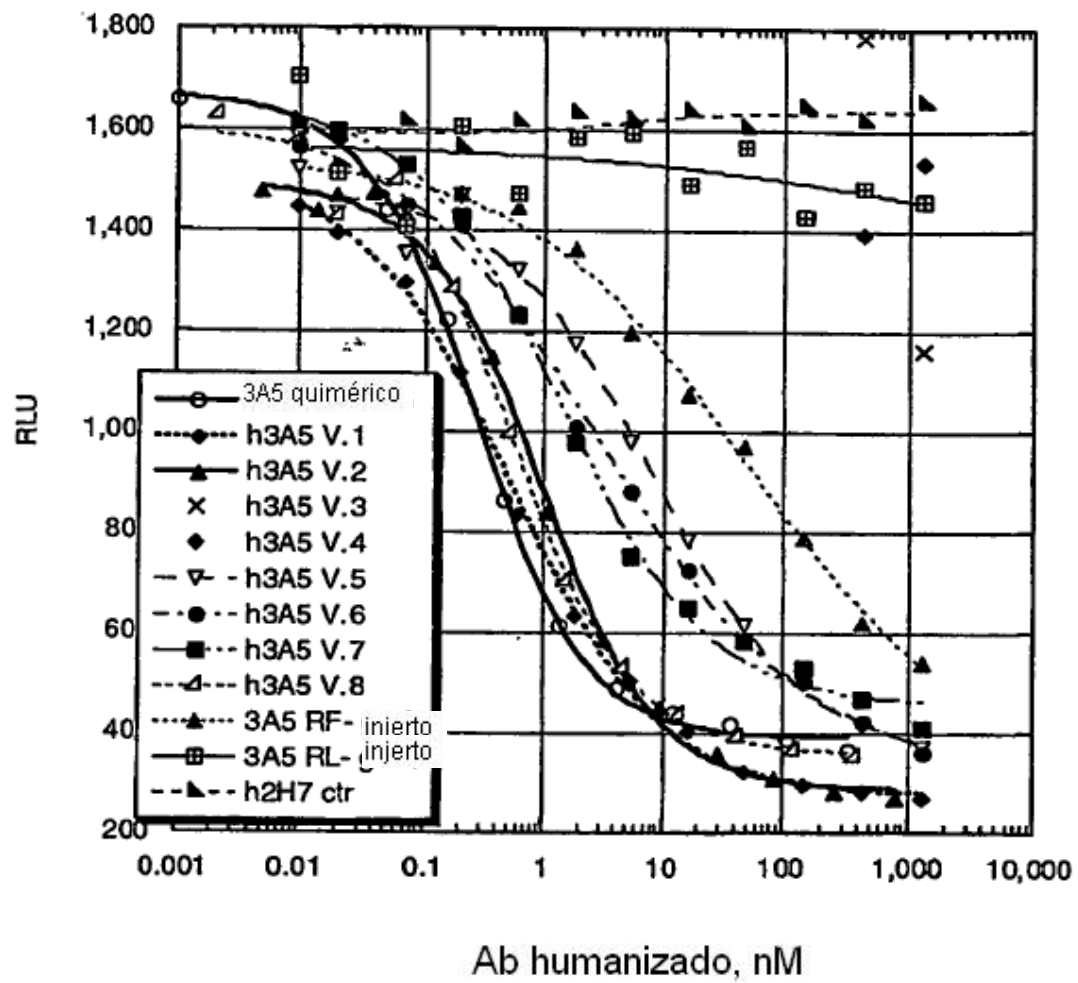


Figura 25

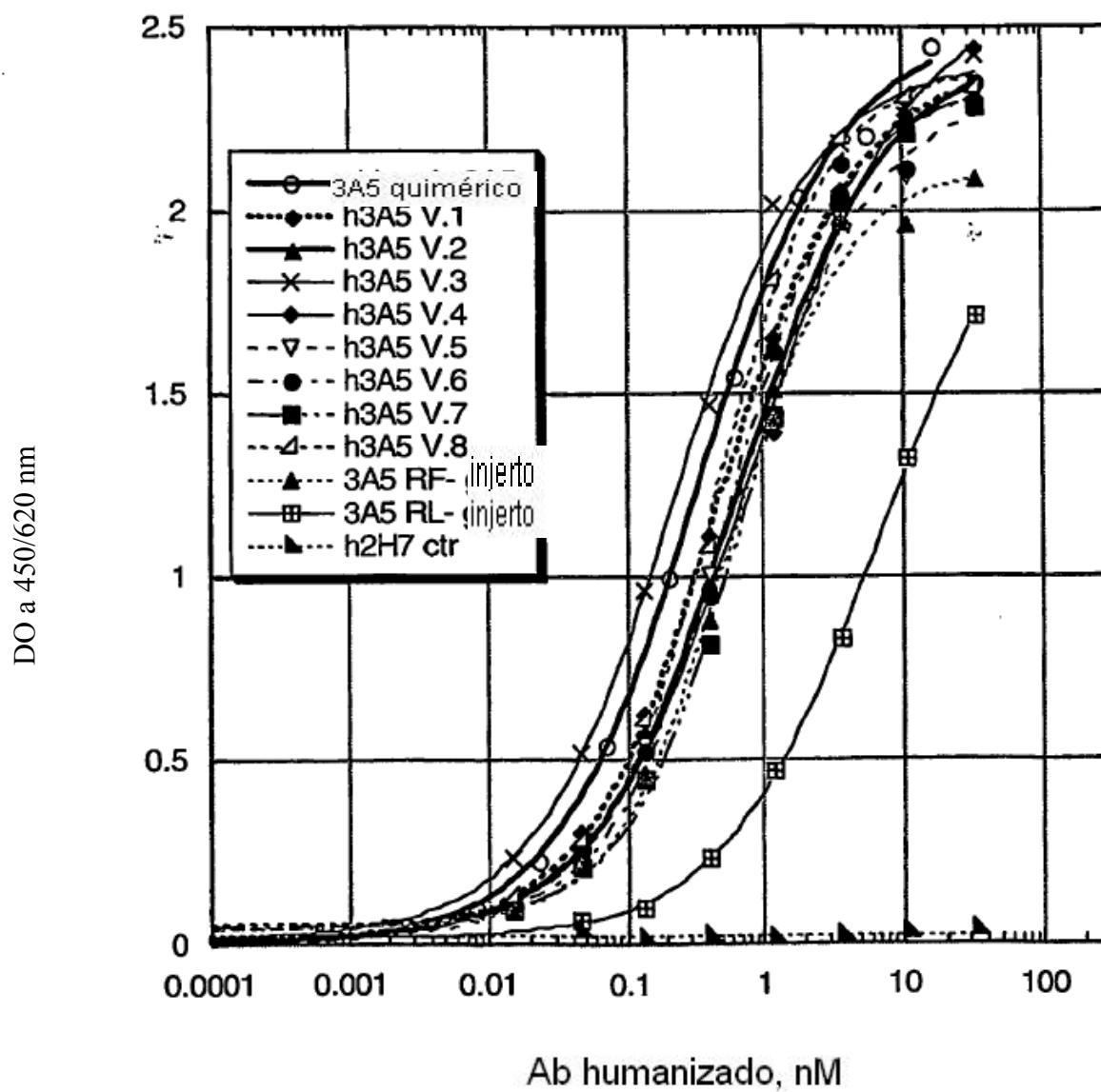


Figura 26

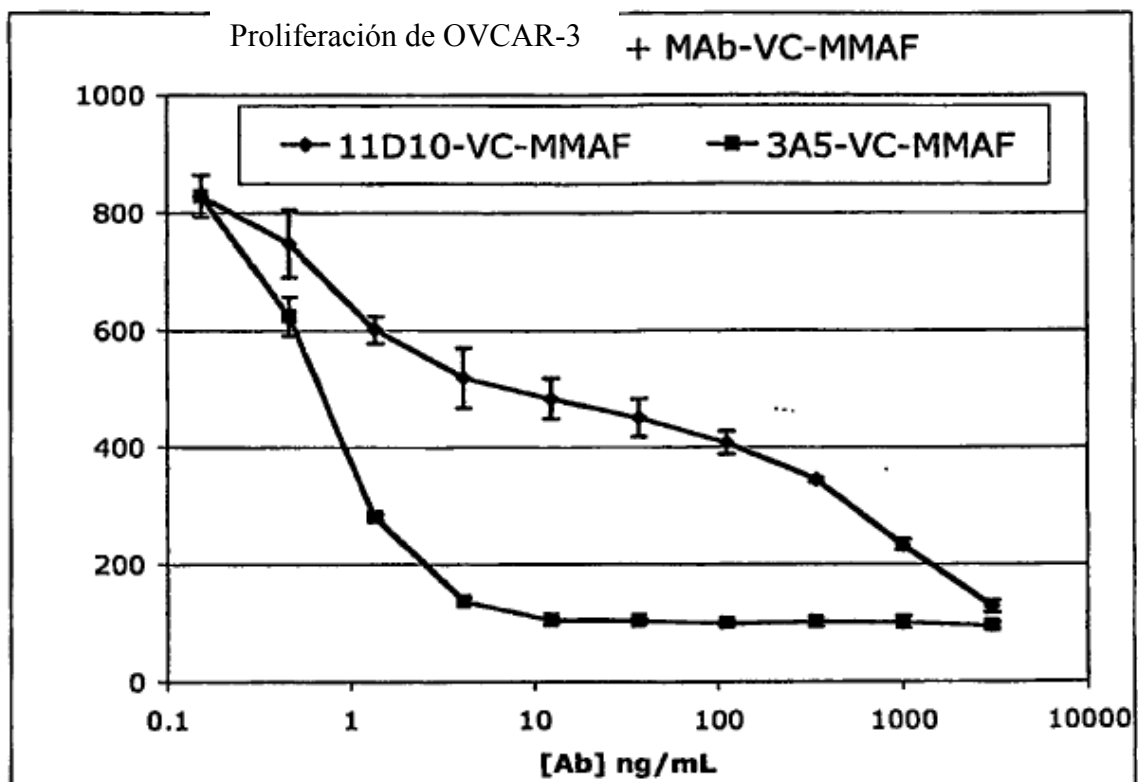


Figura 27

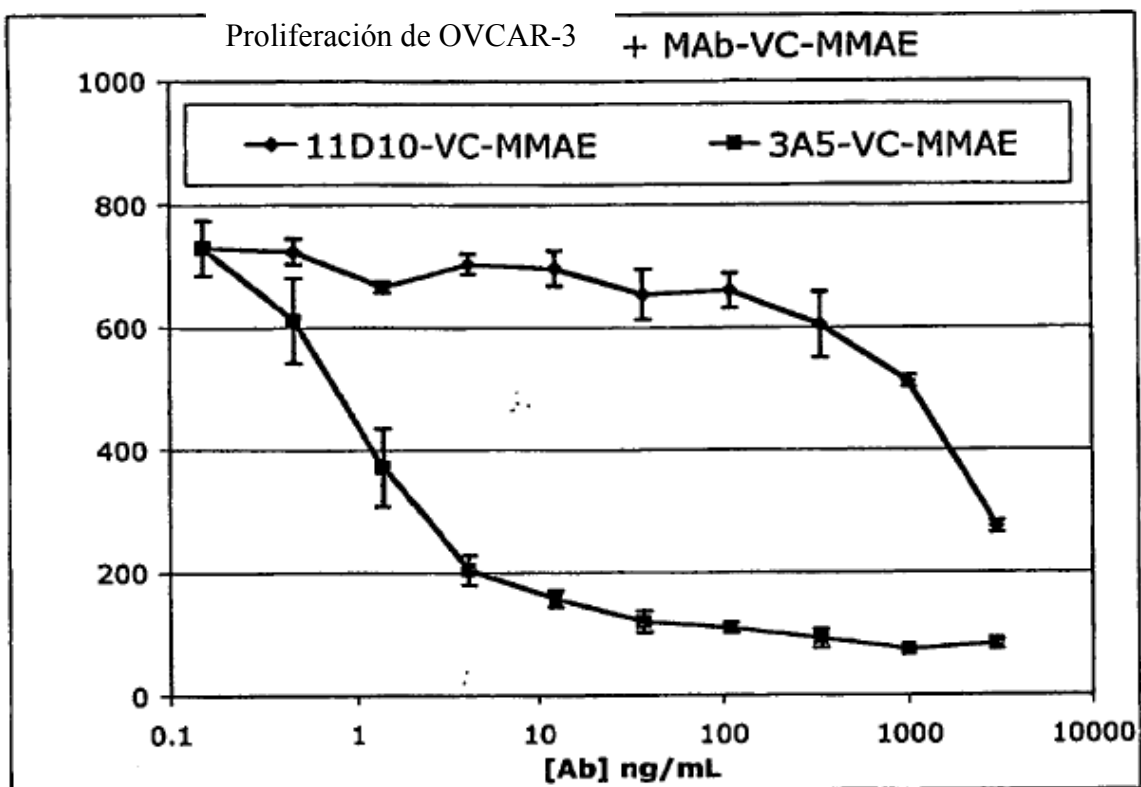


Figura 28

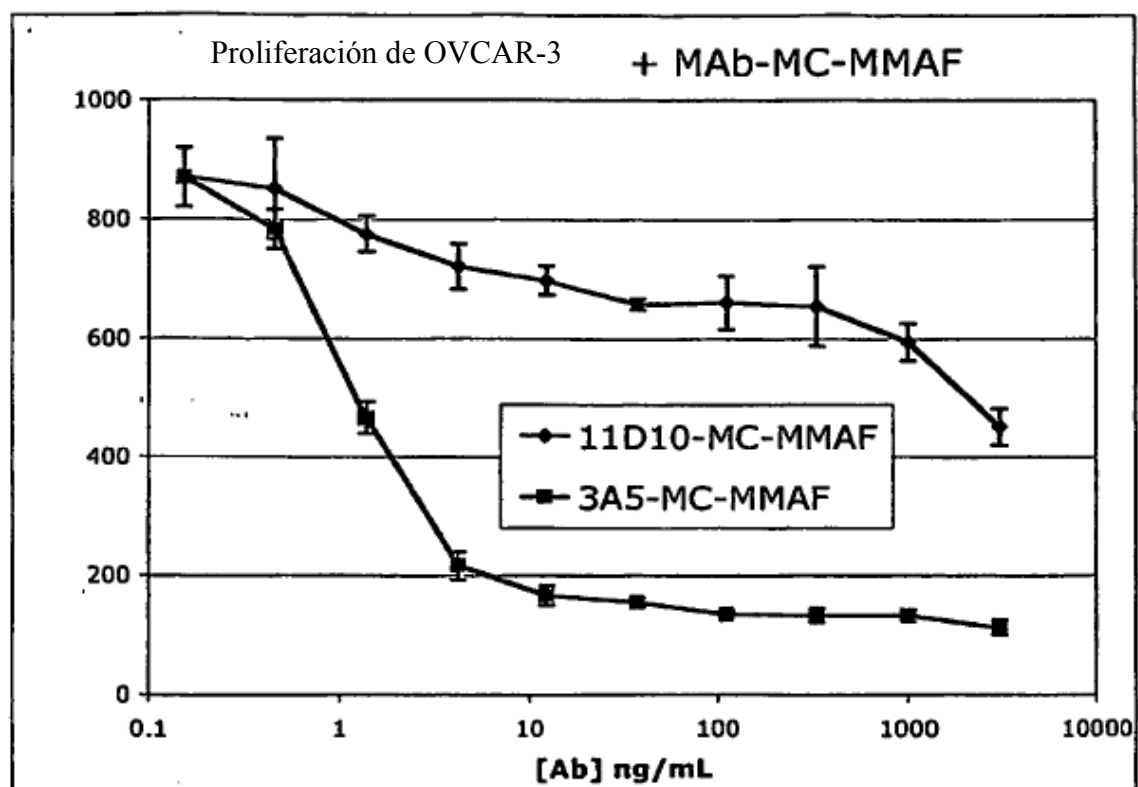


Figura 29

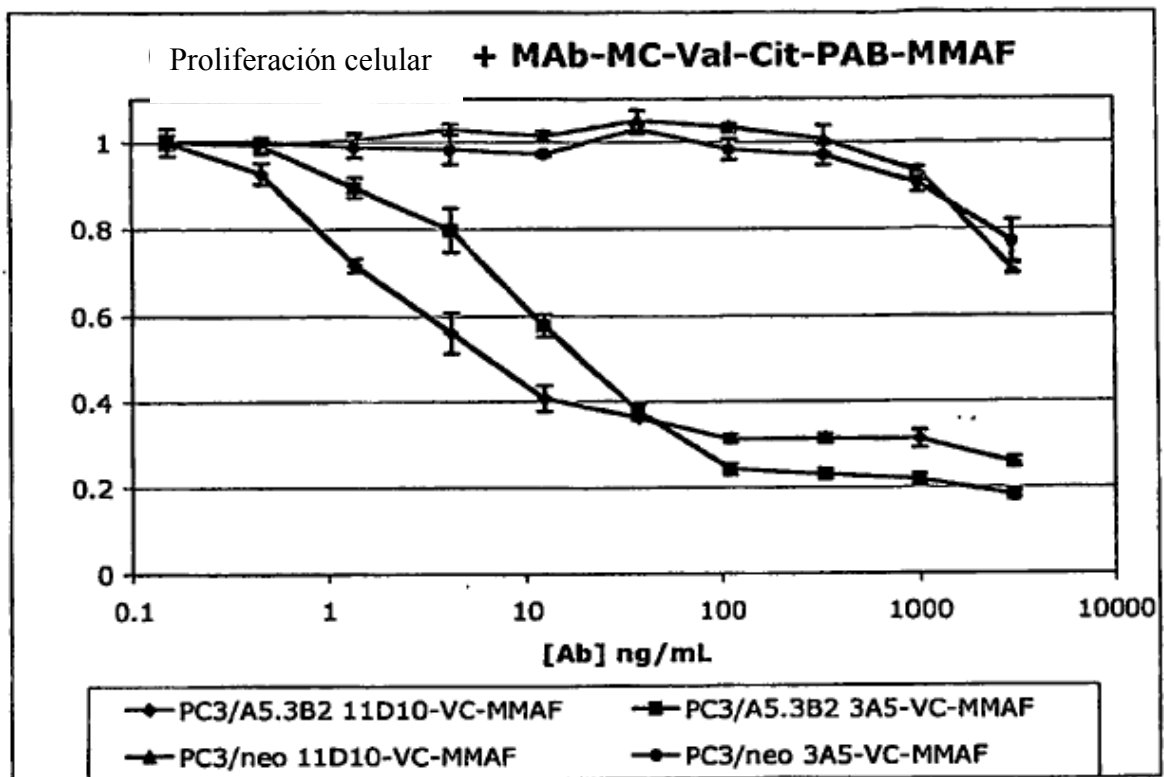


Figura 30

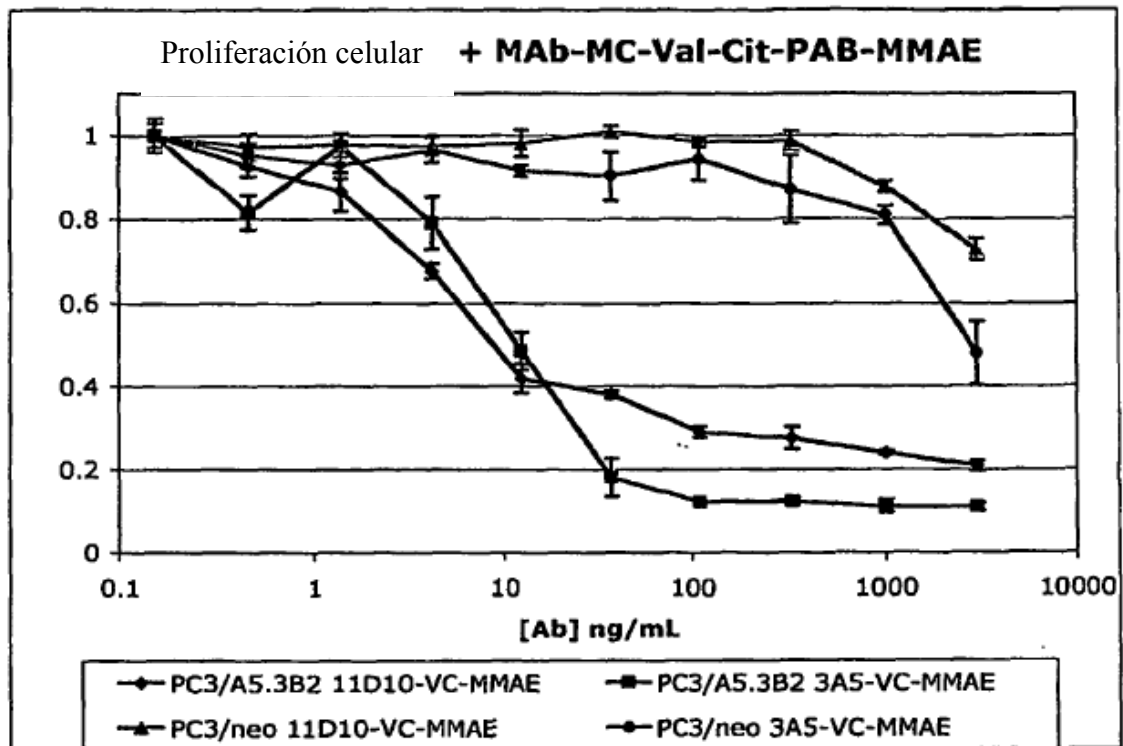


Figura 31

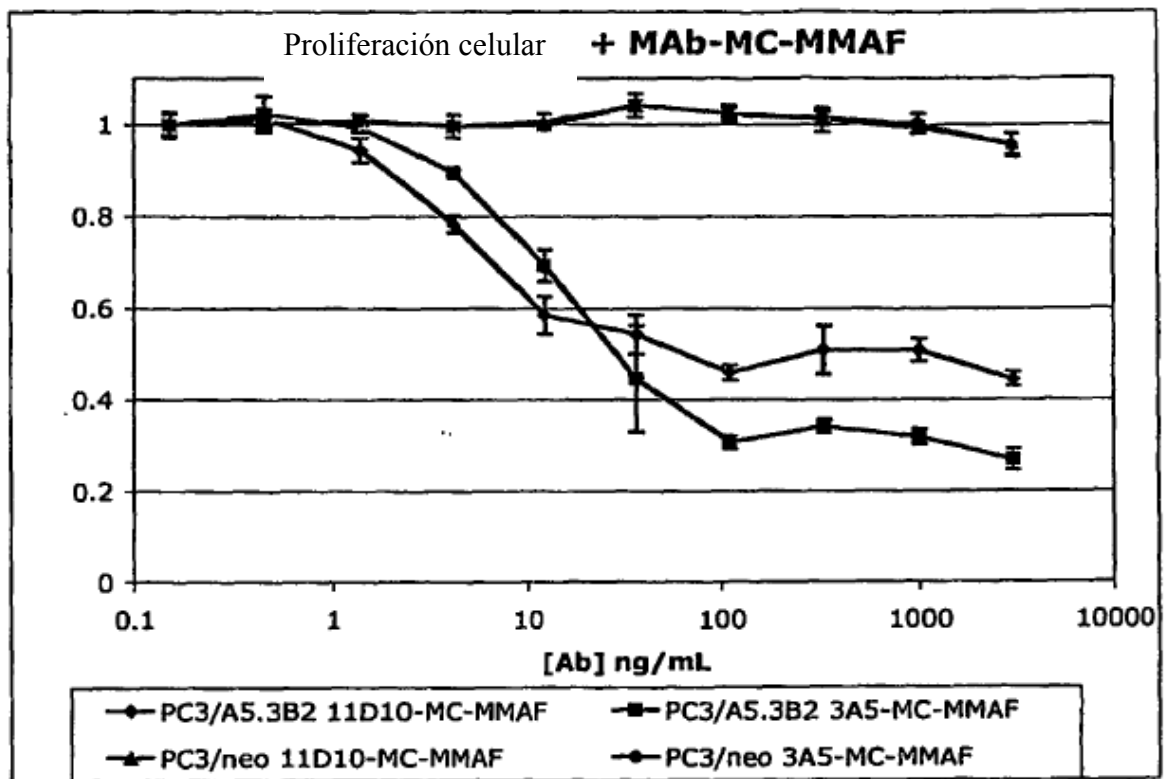


Figura 32

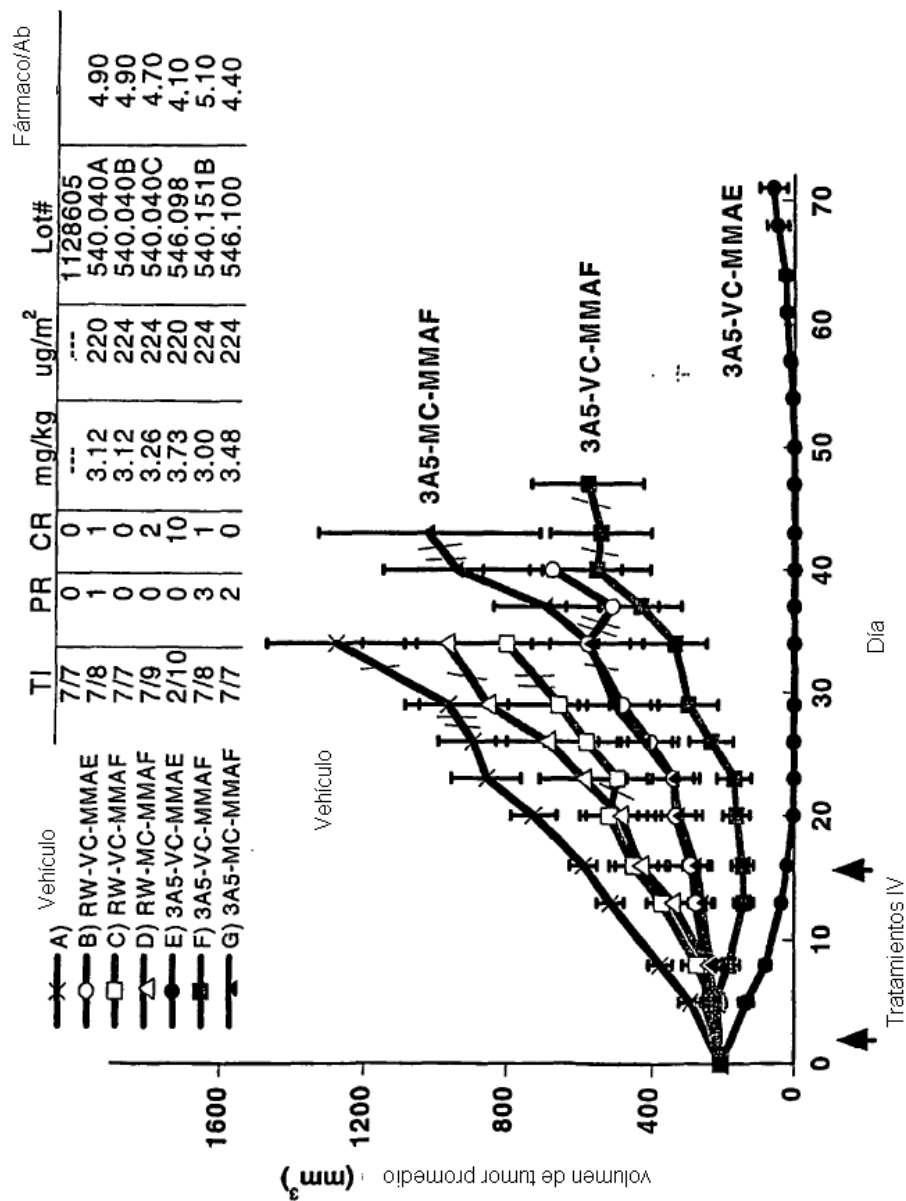


Figura 33

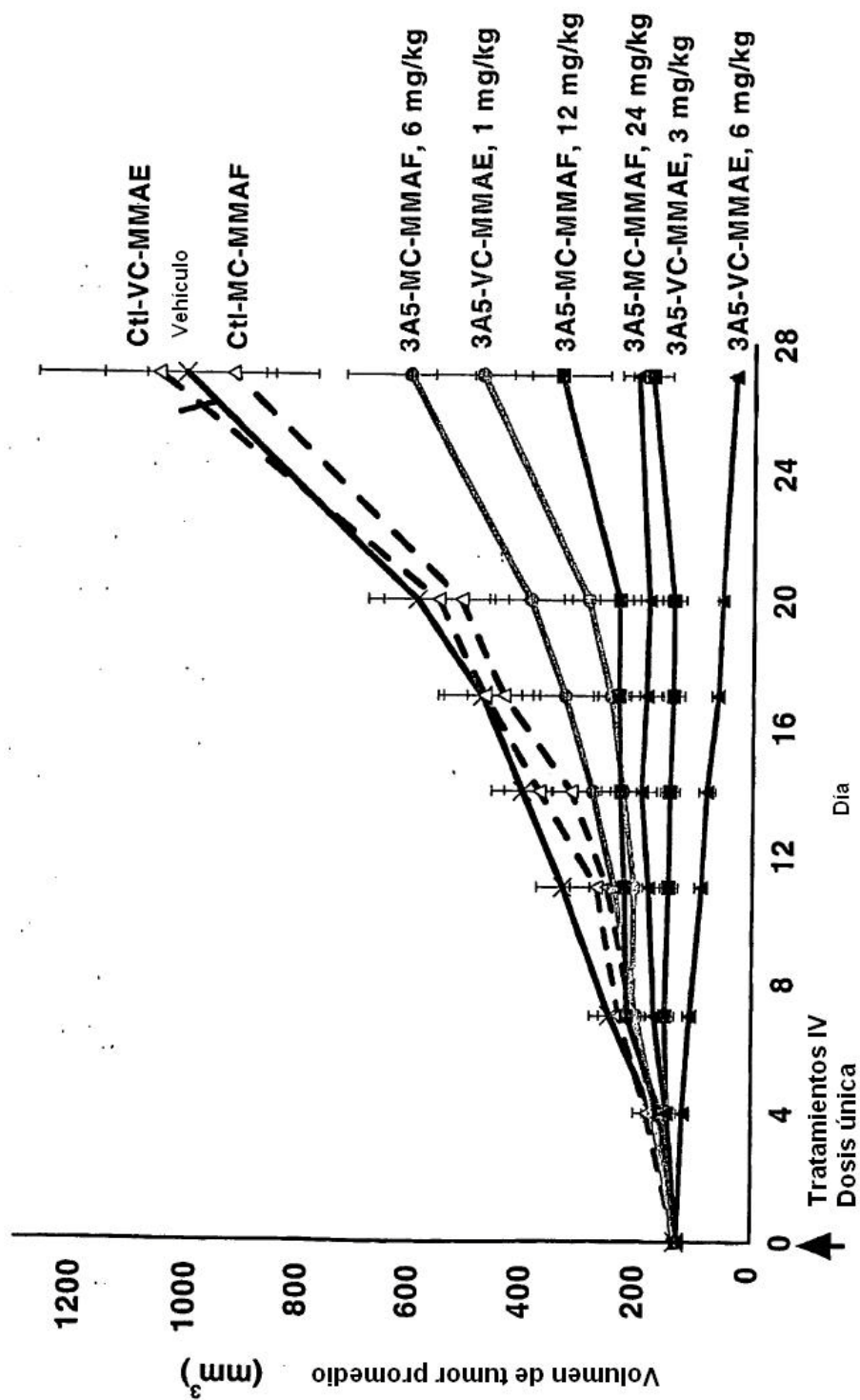


Figura 34

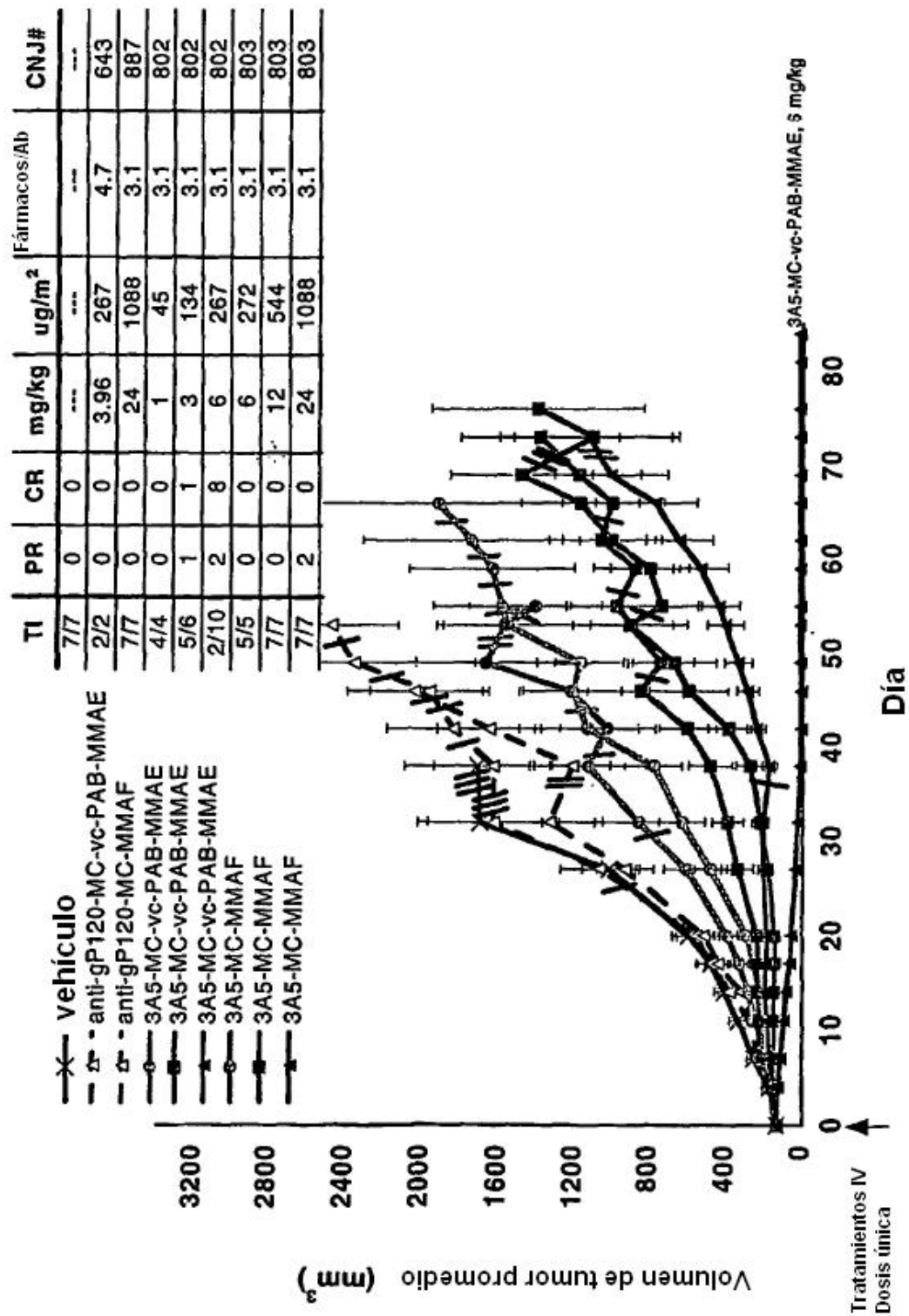


Figura 35

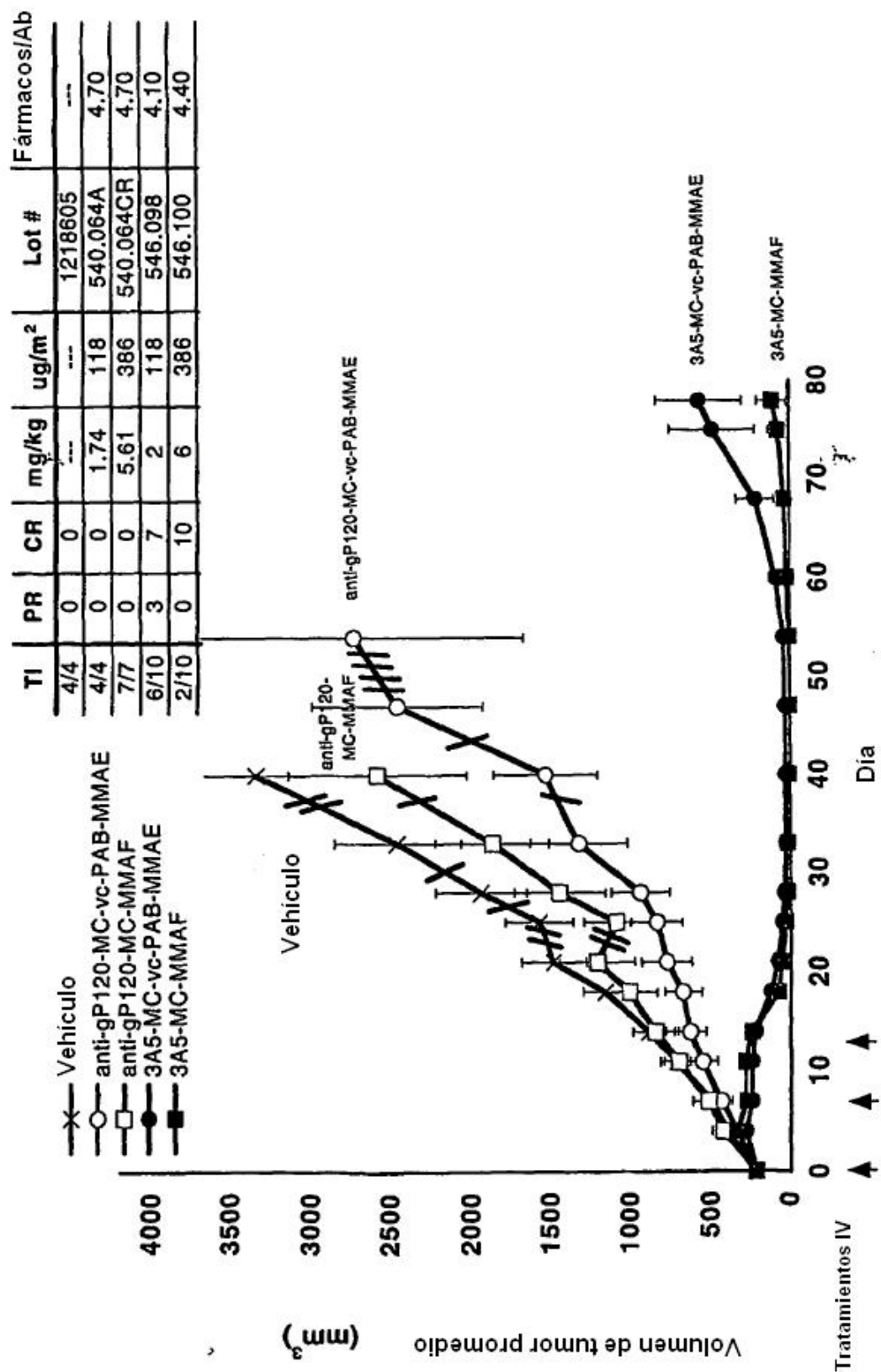


Figura 36

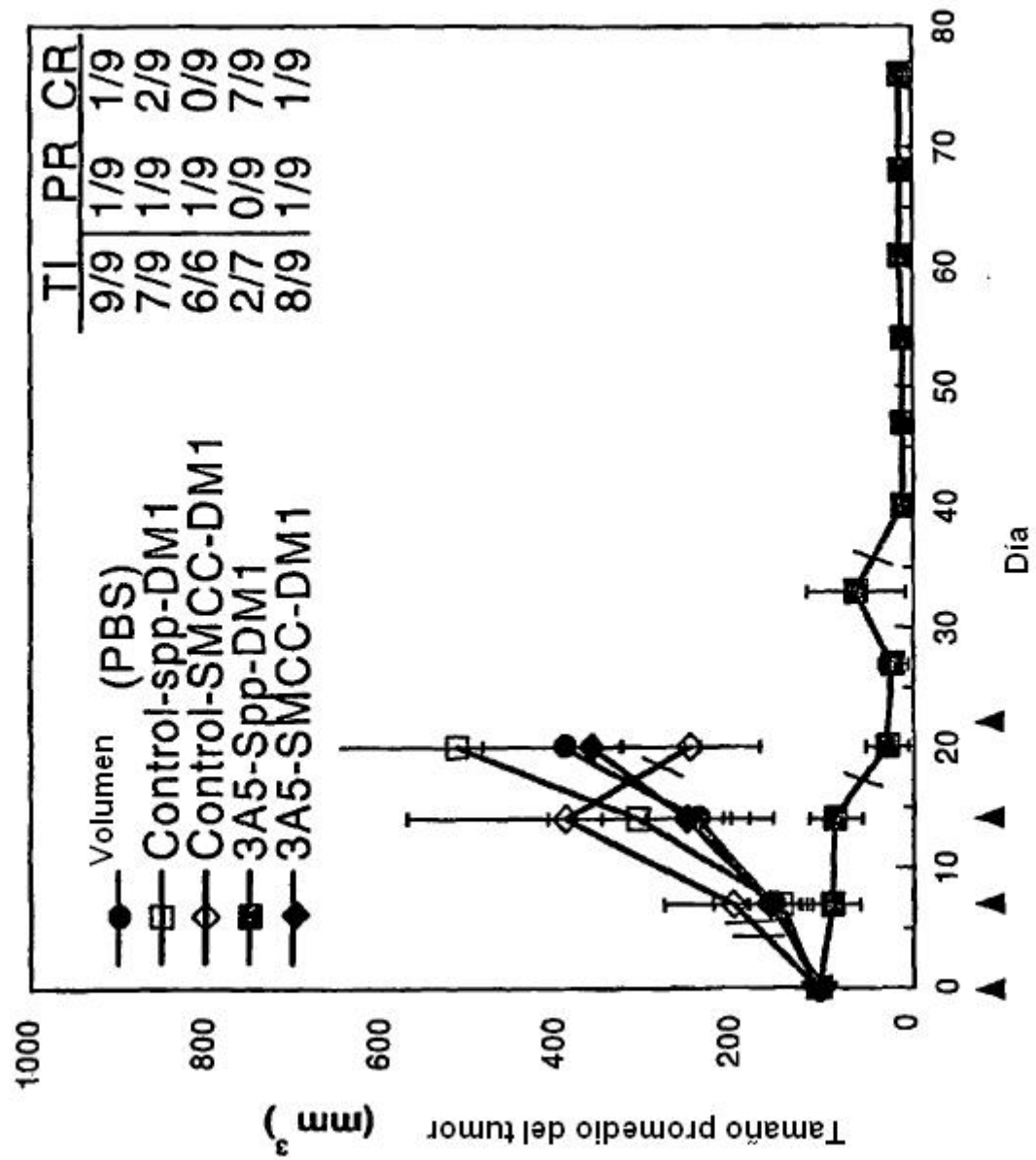


Figura 37

