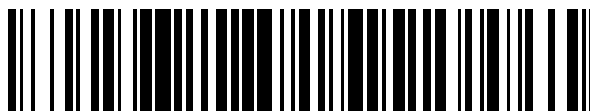


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 280**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03800052 .7**
96 Fecha de presentación: **19.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1581171**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2005**

54 Título: **Anticuerpos que reaccionan frente a GPR64 y utilización de los mismos**

30 Prioridad:
20.12.2002 US 435618 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.10.2012

73 Titular/es:
Abbott Biotherapeutics Corp.
1500 Seaport Boulevard
Redwood City, CA 94063 , US

72 Inventor/es:
LAW, Debbie;
WANG, Qi;
DuBRIDGE, Robert y
BHASKAR, Vinay

74 Agente/Representante:
Arpe Fernández, Manuel

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 2 388 280 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que reaccionan frente a GPR64 y utilización de los mismos.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere a la identificación y generación de anticuerpos que se unen específicamente a proteínas GPR64; y a la utilización de dichos anticuerpos y composiciones que los incluyen en el diagnóstico, la

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El cáncer de ovario es el sexto cáncer más frecuente entre las mujeres, y representa un 5% de todos los cánceres femeninos, siendo la quinta causa de fallecimiento por cáncer entre mujeres. La American Cancer Society predice que habrá aproximadamente 23.100 nuevos casos de cáncer de ovario en este país en el año 2000 y que morirán a causa de esta enfermedad unas 14.000 mujeres. Teniendo en cuenta que muchos cánceres de ovario no pueden detectarse en una fase de desarrollo temprana, representan una proporción desorbitada de los cánceres mortales, siendo los responsables de casi la mitad de los fallecimientos por cáncer del tracto genital femenino, lo que supone más muertes que las causadas por cualquier otro cáncer de los órganos reproductivos.

15

[0003] La mayoría de las pacientes que padecen cáncer epitelial de ovario, la forma predominante, son asintomáticas a lo largo de las fases tempranas de la enfermedad, y suelen tratarse en los estadios III o IV de la enfermedad. Su supervivencia a cinco años es inferior al 25%, encontrándose las menores tasas de supervivencia entre las mujeres afroamericanas. Una minoría de pacientes, a las que se descubrió la enfermedad en un estadio temprano de desarrollo, tienen una supervivencia a cinco años del 80%-90% (Parker, S. L. et. al. Cancer statistics, 1997. CA 1997: 47: 5-27).

20

25

[0004] En ausencia de un historial familiar de cáncer de ovario, el riesgo de sufrir cáncer de ovario a lo largo de la vida es de 1/70. Los factores de riesgo incluyen síndromes cancerígenos familiares (un riesgo de hasta el 82% a la edad de 70 en mujeres con síndrome de mama/ovárico hereditario); historial familiar (1,4% de riesgo a lo largo de la vida sin familiares afectadas, 5% con una familiar afectada, 7% con dos familiares afectadas; Kerlikowske, K. et.al. Obstet Gynecol (1992) 80: 700-707) nuliparidad; edad avanzada; obesidad; historial personal de cáncer de mama, endometrio o colorectal; pocos embarazos; o edad avanzada (>35 años) en el primer embarazo. No obstante, el 95% de todos los cánceres de ovario los sufren mujeres sin factores de riesgo. La utilización de contraceptivos hormonales, la ooforectomía, y la esterilización tubárica reducen el riesgo de padecer cáncer de ovario (Kerlikowske, K. et. al. Obstet Gynecol (1992) 80: 700-707; Grimes, D. A. Am J. Obstet. Gynecol. (1992) 166: 1950-1954; Hankinson, S. E. et. al. (1993) JAMA 270: 2813-2818) no obstante, incluso la ooforectomía bilateral puede no ser completamente efectiva en la prevención del cáncer de ovario.

30

35

[0005] El tratamiento del cáncer de ovario consiste en gran medida en la ooforectomía quirúrgica, terapia anti-hormonal y/o quimioterapia. Aunque muchas pacientes de cáncer de ovario reciben un tratamiento eficaz, las actuales terapias pueden conllevar graves efectos secundarios que reducen la calidad de vida. La decisión sobre un tipo de tratamiento específico suele basarse en diversos parámetros pronósticos y marcadores (Fitzgibbons et al., 2000, Arch. Pathol. Lab. Med. 124:966-978; Hamilton and Piccart, 2000, Ann. Oncol. 11:647-663), incluyendo los marcadores de predisposición genética BRCA-1 y BRCA-2 (Robson, 2000, J. Clin. Oncol. 18:113-118).

40

[0006] La identificación de nuevas dianas terapéuticas y marcadores diagnósticos es esencial a la hora de mejorar el actual tratamiento de las pacientes con cáncer de ovario. Los recientes avances conseguidos en el campo de la medicina molecular han aumentado el interés por los antígenos de superficie celular específicos del tumor, que pudiesen servir de dianas en diversas estrategias de inmunoterapia y de fármacos de molécula pequeña. Los antígenos adecuados para las estrategias inmunoterapéuticas deberían estar altamente expresados en los tejidos cancerígenos y, en condiciones ideales, no deberían estar expresados en absoluto en tejidos normales adultos. Sin embargo, podría tolerarse su expresión en tejidos que no resulten críticos para la vida. Entre los ejemplos de dichos antígenos se pueden citar el Her2/neu y el antígeno de las células B CD20. Actualmente se utilizan anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos al Her2/neu (Herceptin®(trastuzumab) para el tratamiento del cáncer de mama metastásico (Ross and Fletcher, 1998, Stem Cells 16:413-428). Del mismo modo, los anticuerpos monoclonales anti-CD20 (Rituxin®/rituximab) se utilizan para tratar con eficacia los linfomas no-Hodgkin (Maloney et al., 1997, Blood 90:2188-2195; Leget and Czuczman, 1998, Curr. Opin. Oncol. 10:548-551).

45

50

[0007] Se han identificado posibles dianas inmunoterapéuticas para el cáncer de ovario. Una de dichas dianas es la mucina epitelial polimórfica (MUC1). La MUC1 es una proteína transmembrana que se encuentra presente en la superficie apical de las células epiteliales glandulares. Con frecuencia suele estar sobreexpresada en el cáncer de ovario, presentando generalmente un patrón de glicosilación alterado, constituyendo una molécula distinta desde el punto de vista de los antígenos. Y se encuentra en la fase de los primeros ensayos clínicos como una diana para vacunas (Gilewski et al., 2000, Clin. Cancer Res. 6: 1693-1701; Scholl et al., 2000, J. Immunother. 23:570-580). La proteína expresada por el tumor suele estar desprendida en la circulación, donde resulta detectable como marcador tumoral, CA 15-3 (Bon et al., 1997, Clin. Chem. 43:585-593). Sin embargo, muchas pacientes presentan tumores

55

60

que no expresan ni HER2 ni MUC-1; por lo tanto, es evidente que hay que identificar otras dianas para gestionar las enfermedades localizadas y metastásicas.

[0008] Aunque la industria y el mundo académico han identificado nuevas secuencias, no se ha ejercido el mismo esfuerzo a la hora de identificar la función de dichas nuevas secuencias. La elucidación de una función para las nuevas proteínas y compuestos en estados de la enfermedad para la identificación de las dianas terapéuticas y marcadores de diagnóstico resulta esencial a la hora de mejorar los actuales tratamientos de las pacientes con cáncer de ovario. Por consiguiente, en el presente documento se facilita una diana molecular para la intervención terapéutica en cánceres de ovarios y de otro tipo. Adicionalmente, en este documento también se facilita una serie de métodos que pueden emplearse con esta diana en el diagnóstico y la prognosis del cáncer de ovario.

[0009] La proteína GPR64 se ha visto implicada en ciertas enfermedades cancerígenas, como el cáncer de ovario, el sarcoma de Ewing y el cáncer de útero. Sería deseable disponer de anticuerpos que resulten útiles para el diagnóstico, la prognosis y el tratamiento eficaz del cáncer, incluyendo el cáncer metastásico. Por consiguiente, en este documento se facilitan composiciones y métodos que pueden utilizarse para el diagnóstico, la prognosis y la terapia de determinados cánceres.

[0010] La GPR64 (también denominada en la literatura científica Ovl y HE6, y a la que en ocasiones se denomina en este documento y en las figuras OAM6) receptor huérfano acoplado a proteínas G con un amplio dominio N-terminal extracelular fuertemente glicosilado.

[0011] La GPR64 ha sido clonada por Osterhoff et al., (1997, DNA AND CELL BIOLOGY 16:379-389) como un receptor acoplado de la proteína G (GPCR) específico de la epididimis.

[0012] Los perfiles de expresión del gen descritos en USSN 10/173,999, presentada el 17 de junio de 2002 y publicada con el número de publicación US 2004 005563, así como los ejemplos contenidos en este documento, indican que la GPR64 está sobreexpresada en los tejidos con cáncer de ovario, en comparación con los tejidos normales.

[0013] Un análisis bioinformático de la secuencia del gen de la GPR64 basado en la información de una base de datos pública sugiere que el producto proteínico contiene una secuencia de señal, un amplio dominio extracelular (619 aminoácidos) y siete dominios de transmembrana, y se ha predicho su localización en la membrana del plasma, funcionando como un receptor acoplado de la proteína G. Esto convierte a la GPR64 en una diana atractiva para los anticuerpos terapéuticos.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0014] La presente invención proporciona anticuerpos anti-GPR64 que se unen al mismo epítopo de un polipéptido de la GPR64, como el GPR64-18, y que resultan útiles para obtener anticuerpos conjugados con fines terapéuticos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GPR64 de la invención se pueden utilizar como agentes citotóxicos selectivos contra las células tumorales que expresan la GPR64 (por ejemplo, células del cáncer de ovario, cáncer de útero y sarcoma de Ewing). En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse terapéuticamente para el tratamiento de aquellos pacientes de los que se sospeche o a los que se les haya diagnosticado cáncer y/u otras condiciones proliferativas, incluyendo condiciones proliferativas benignas. En un aspecto, los anticuerpos del GPR64 de la presente invención se utilizan en el tratamiento de condiciones proliferativas del ovario, incluyendo, por ejemplo, cáncer de ovario. Los anticuerpos también pueden utilizarse para el tratamiento del cáncer de útero, el sarcoma de Ewing o cualquier otra enfermedad asociada a la GPR64 con expresión de proliferación celular.

[0015] La presente invención facilita anticuerpos con una elevada afinidad para la proteína GPR64 (SEQ ID NO:2) codificada por la secuencia de nucleótido SEQ ID NO: 1. (Hs.421137, NM_005756.1). En una realización, la presente invención facilita un anticuerpo que inhibe de forma competitiva el enlace de un polipéptido GPR64 con el anticuerpo GPR64-18. En la figura 5 se muestran otros anticuerpos seleccionados que pueden resultar útiles para esta realización. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo conjugado con un grupo o componente efector. El grupo efector puede ser una etiqueta (por ejemplo, una etiqueta fluorescente, un dominio efector, por ejemplo, MicA) pero también puede ser un agente citotóxico (por ejemplo, un radioisótopo o un agente químico citotóxico). En una realización preferida, el anticuerpo de la presente invención puede ser el agente citotóxico auristatina. En otras realizaciones, los anticuerpos pueden utilizarse en solitario para inhibir el crecimiento de las células tumorales. En otra realización preferida de la invención, el anticuerpo actúa como mediador de la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

[0016] Los anticuerpos de la GPR64 facilitados por la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, humanos y humanizados. En algunas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos primatizados de la GPR64 para el tratamiento de pacientes primates. La presente invención proporciona anticuerpos de la GPR64 que son anticuerpos completos, así como fragmentos del anticuerpo de la GPR64. En las realizaciones preferidas, los fragmentos del anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diacuerpos rlgG, anticuerpos de cadena única, y anticuerpos multispecíficos.

[0017] Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos que presentan una homología del 95% o superior con las secuencias del nucleótido y del aminoácido de las regiones V_H y V_L descritas en la Figura 2 (SEQ ID NOs: 3-22). En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo que comprende SEQ ID NO:17 y/o la SEQ ID NO:18, que se corresponden con las regiones V_H y V_L del anticuerpo GPR64-18, respectivamente.

[0018] La presente solicitud también se refiere a un anticuerpo monoclonal (o fragmento de anticuerpo del mismo) que une un polipéptido que comprende una secuencia homóloga, al menos en un 80% (y preferiblemente homóloga en un 98%) a la secuencia que va desde el aminoácido 1 hasta el aminoácido 588 de la GPR64 (SEQ ID NO:2) inclusive. El anticuerpo monoclonal de la GPR64 puede ser quimérico, humanizado o humano. Asimismo, el anticuerpo monoclonal puede competir por un emplazamiento de enlace de ligando en la GPR64, y puede inhibir la proliferación in vivo de células tumorales, pudiendo dichas células tumorales seleccionarse entre las pertenecientes al grupo consistente en cáncer de ovario, sarcoma de Ewing, cáncer de útero y otras células tumorales con expresión de la GPR64. El anticuerpo monoclonal puede estar conjugado con un grupo efector, como un agente citotóxico (por ejemplo, auristatina). El anticuerpo monoclonal puede mediar en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo.

[0019] En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une con el mismo epítipo de la GPR64 que el enlazado por un anticuerpo seleccionado entre el grupo formado por la GPR64-18.

[0020] La solicitud muestra células capaces de producir cualquiera de las realizaciones de los anticuerpos de la GPR64, en las que la célula receptora se selecciona en el grupo formado por las células ováricas del hamster chino (CHO), E. coli, células de levadura, y células de insectos.

[0021] La invención también proporciona composiciones farmacológicas que comprenden un excipiente farmacológicamente aceptable y cualquiera de las realizaciones de anticuerpos de la GPR64 de la invención. En algunas realizaciones de la composición farmacológica, el anticuerpo de la GPR64 se conjuga con un grupo o componente efector. El componente efector puede ser una etiqueta (por ejemplo, una etiqueta fluorescente) o un agente citotóxico (por ejemplo, un radioisótopo o un grupo químico citotóxico). La invención proporciona una serie de agentes citotóxicos que pueden conjugarse con un anticuerpo de la GPR64 incluyendo: cadena A de la difteria, cadenas A de la exotoxina, cadena A del ricino, cadena A de la abrina, curcina, crotina, fenomicina, neomicina y auristatina. En una realización preferida, el agente citotóxico es la auristatina. Los anticuerpos de las composiciones farmacológicas pueden ser anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, rIgG, diacuerpos, anticuerpos de cadena única y anticuerpos multiespecíficos). En algunas realizaciones, la composición farmacológica incluye un anticuerpo quimérico, humanizado o humano de la GPR64.

[0022] La invención también aporta métodos para la inhibición de la proliferación de una célula asociada al cáncer de ovario. El método comprende la puesta en contacto de la célula con el anticuerpo de la GPR64 de la invención. En la mayoría de las realizaciones, la célula cancerígena se encuentra en un paciente, y normalmente, un ser humano. Se puede diagnosticar, y el paciente puede someterse al mismo, un régimen terapéutico para el tratamiento de un cáncer de ovario metastásico, o simplemente, puede sospecharse la existencia de un cáncer de ovario.

[0023] La presente solicitud también aporta métodos de tratamiento que utilizan la GPR64 y las realizaciones de la composición asociadas. Por ejemplo, la solicitud muestra un método de inhibición del crecimiento de las células tumorales, que comprende: la administración a un mamífero (preferiblemente un ser humano) de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo capaz de unirse a una secuencia de aminoácido que tenga una homología de al menos un 80% con una secuencia del aminoácido 1 hasta el aminoácido 588 inclusive de SEQ ID NO:2. Preferiblemente, el anticuerpo del método se conjuga con un grupo efector (por ejemplo, auristatina), o el anticuerpo media en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, donde dicho método inhibe el crecimiento de las células tumorales que comprenden un carcinoma seleccionado entre el grupo consistente en cáncer de ovario, sarcoma de Ewing, cáncer de útero y otros tipos de células tumorales que expresan la GPR64.

[0024] Alternativamente, el método comprende la administración de un anticuerpo y de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente citotóxico a un paciente, pudiendo los anticuerpos y el agente citotóxico administrarse simultáneamente, o bien uno antes del otro. En otra alternativa, el agente citotóxico se conjuga con el anticuerpo y se añade de forma simultánea.

[0025] La aplicación muestra adicionalmente pruebas de diagnóstico e inmunoensayos que utilizan las diversas realizaciones del anticuerpo de la GPR64, que implican la detección de un cáncer en una muestra biológica procedente de un paciente, poniendo en contacto la muestra biológica con un anticuerpo de la invención, donde el anticuerpo se conjuga con una etiqueta, como una etiqueta fluorescente o un radioisótopo.

[0026] La aplicación de la presente invención muestra también un método para el diagnóstico de un tumor en un mamífero, que comprende: la puesta en contacto de un anticuerpo con una muestra de prueba obtenida del mamífero; y la detección de la formación de un complejo entre el anticuerpo y un polipéptido de la muestra de prueba; donde el anticuerpo se une con el polipéptido que incluye una secuencia de aminoácido que tiene una

homología de al menos un 80% con la secuencia que va desde el aminoácido 1 hasta el aminoácido 588 de SEQ ID NO:2, inclusive. En las realizaciones preferidas de este método, la muestra de prueba se obtiene de un individuo del que se sospecha que padece un crecimiento o proliferación celular neoplásica, o de un individuo del que se sospecha que padece cáncer de ovario.

[0027] Alternativamente, la aplicación muestra un método para la producción de unos elevados niveles de titulación de anticuerpos específicos de proteínas receptoras de la superficie celular, incluyendo: introducir en un receptor de superficie celular una mutación que desacople el receptor de su sistema de señalización; transfección y expresión del receptor mutante en una línea celular; y la inmunización pasiva de un mamífero con la línea celular; donde los anticuerpos específicos del receptor de la superficie celular se producen a unos niveles de titulación elevados. Este método puede ejecutarse cuando el receptor de la superficie celular es un receptor acoplado a una proteína G, y preferiblemente, la GPR64. En otras realizaciones preferidas, la mutación del método es una mutación DRY box y la línea celular utilizada en el método es la línea celular singéica Balb/c 3T12.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0028]

La figura 1 muestra las secuencias del nucleótido y del aminoácido de la GPR64 (SEQ ID NOS: 1 y 2).

La figura 2 muestra las secuencias del nucleótido y del aminoácido de las regiones V_H y V_L de los cinco anticuerpos anti-GPR64: GPR64-1, -16, -18, -20 y -48. (SEQ ID NOS: 3-22).

La figura 3 muestra los trazados de los datos de la prueba de crecimiento a los 4 días, que muestran la modulación a la baja de la expresión de la GPR64 por el ARNi en la proliferación celular en células cancerosas con expresión de la GPR64.

La figura 4 muestra una lista de datos que muestran la modulación a la baja de la expresión de la GPR64 por el ARNi en la proliferación celular en células cancerosas con expresión de la GPR64.

La figura 5 muestra una tabla en la que se resumen los resultados de los estudios de enlaces en una muestra de 42 anticuerpos monoclonales anti-GPR64.

La figura 6 muestra imágenes de la tinción inmunohistoquímica de diversos tipos de muestras de tejidos de cáncer de ovario con el anticuerpo monoclonal de la GPR64-101.

La figura 7 muestra imágenes de la tinción inmunohistoquímica de diversos tipos de muestras de tejidos normales con el anticuerpo de la GPR64-101.

La figura 8 muestra trazados de crecimiento tumoral a lo largo de un xenoinjerto in vivo de células H460 con diversos anticuerpos monoclonales de la GPR64.

La figura 9 muestra un esquema del conjugado mAb-auristatina (mAb-VCAE) y un trazado del crecimiento de las células H460 a los cuatro días, en presencia de diversos conjugados de la GPR64 mAb-VCAE.

La figura 10 muestra un trazado del crecimiento tumoral *in vivo* de células H460 durante un régimen de dosificación con GPR64-81, y conjugados -93 mAb-VCAE.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0029] La presente invención facilita nuevos reactivos y métodos para el tratamiento, el diagnóstico y la prognosis de determinados cánceres utilizando anticuerpos que actúan contra la GPR64. Concretamente, la presente invención proporciona anticuerpos anti-GPR64 que se unen al mismo epítopo de un polipéptido de GPR64 como el GPR64-18 y que resultan especialmente útiles como agentes citotóxicos selectivos para las células que expresan la GPR64.

[0030] El mapeado de los epítopos de anticuerpos que muestran una elevada afinidad de unión puede llevarse a cabo mediante análisis de enlace competitivos bien conocidos en la técnica y que se describen seguidamente. Utilizando esta metodología pueden reconocerse anticuerpos que reconocen diversos epítopos individuales. A continuación se evalúa en los anticuerpos la muerte in vitro de células dependientes de la GPR64. Mediante la utilización de estos métodos pueden identificarse anticuerpos que promueven una cantidad importante de muertes celulares.

Definiciones

[0031] Tal y como se utiliza en el presente documento, "anticuerpo" incluye la referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva a un antígeno específico, e incluye tanto anticuerpos monoclonales como policlonales. El término también incluye formas genéticamente modificadas, como los anticuerpos quiméricos (*por ejemplo*, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (*por ejemplo*, anticuerpos bispecíficos). El término "anticuerpo" también incluye formas de enlaces de antígeno de anticuerpos, incluyendo

fragmentos con capacidad de enlace de antígeno (*por ejemplo*, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rIgG). Véase igualmente, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Véase también, *por ejemplo*, Kubly, J., Immunology, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York (1998). El término también se refiere a fragmentos Fv recombinantes de cadena única (scFv). El término anticuerpo también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Las moléculas bivalentes y biespecíficas se describen, *por ejemplo*, en Kostelny et al. (1992) J Immunol 148:1547, Pack y Pluckthun (1992) Biochemistry 31:1579, Hollinger et al., 1993, *supra*, Gruber et al. (1994) J Immunol: 5368, Zhu et al. (1997) Proteína Sci 6:781, Hu et al. (1996) Cancer Res. 56:3055, Adams et al. (1993) Cancer Res. 53:4026, y McCartney, et al. (1995) Proteína Eng. 8:301.

[0032] Puede generarse un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno específico mediante métodos recombinantes como la selección de librerías de anticuerpos recombinantes en vectores del fago o similares, véase, *por ejemplo*, Huse et al., Science 246: 1275-1281 (1989); Ward et al., Nature 341:544-546 (1989); y Vaughan et al., Nature Biotech. 14:309-314 (1996), o mediante la inmunización de un animal con el antígeno o con un ADN que codifique el antígeno.

[0033] Por lo general, una inmunoglobulina posee una cadena pesada y una cadena ligera. Cada una de las cadenas ligera y pesada contiene una región constante y una región variable (las regiones también se denominan "dominios"). Las regiones variables de cadenas ligeras y pesadas contienen cuatro regiones "marco" interrumpidas por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones de determinación de la complementariedad" o "CDRs". Se ha definido la extensión de las regiones marco y las CDRs. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan relativamente dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, que es la combinación de las regiones marco de las cadenas constituyentes ligeras y pesadas, sirve para situar y alinear las CDRs en el espacio tridimensional.

[0034] Las CDRs son responsables primordialmente de realizar la unión de un antígeno a un epítopo. Las CDRs de cada cadena suelen denominarse normalmente CDR1, CDR2, y CDR3, numerándose secuencialmente a partir del extremo N-terminal, y también se identifican típicamente mediante la cadena en la que se encuentra situada la CDR concreta. De este modo, una CDR3 V_H se encuentra situada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se ha hallado, mientras que una CDR1 V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se halla situada.

[0035] Las referencias a "V_H" o a una "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo las cadenas pesadas de un fragmento Fv, scFv o Fab. Las referencias a "V_L" o a una "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo las cadenas ligeras de un fragmento Fv, scFv o Fab.

[0036] La frase "Fv de cadena única" o "scFv" se refiere a un anticuerpo en el que los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo tradicional de dos cadenas se han unido para formar una cadena. Normalmente, se inserta un péptido enlazador entre las dos cadenas para permitir que se doblen adecuadamente y crear un punto de enlace activo.

[0037] Un anticuerpo que presente una región constante sustancialmente idéntica a una región constante natural de un anticuerpo de la clase IgG se refiere a un anticuerpo en el que cualquiera de sus regiones constantes presentes es sustancialmente idéntica, es decir, al menos idéntica en torno a un 85-90%, y preferiblemente, idéntica al menos en un 95% a la secuencia de aminoácido de la región constante del anticuerpo natural de la clase IgG.

[0038] El término "anticuerpo monoclonal", según se utiliza en el presente documento, no se limita a los anticuerpos producidos mediante la tecnología del hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico o fago, y no el método mediante el cual se produce. Los anticuerpos monoclonales que resultan útiles con la presente invención pueden prepararse utilizando una amplia gama de técnicas conocidas en el sector, incluyendo la utilización de las tecnologías del hibridoma, recombinante y "phage display", o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales utilizando técnicas de hibridoma, incluyendo las ya conocidas por la técnica y que se enseñan, *por ejemplo*, en Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1988); Hammerling et al., in: "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas," Elsevier, New York (1981), pp. 563-681.

[0039] En muchas utilizaciones preferidas de la presente invención, incluyendo la utilización *in vivo* de los anticuerpos de la GPR64 en humanos y los ensayos de detección *in vitro*, puede resultar preferible la utilización de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos.

[0040] Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de inmunoglobulina en la cual (a) la región constante, o una porción de la misma, se ve alterada, sustituida o intercambiada de forma que el punto de enlace del antígeno (región variable) está enlazado a una región constante de una clase, función efector y/o especie diferente o alterada, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, *por ejemplo*, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se ve alterada, sustituida o intercambiada por una región variable con una especificidad de antígeno diferente o

alterada. En la técnica se conocen métodos para la producción de anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202-1207 (1985); Ci et al, BioTechniques 4:214-221 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989); y las patentes estadounidenses Nos. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

[0041] El término “anticuerpo humanizado” o “inmunoglobulina humanizada” se refiere a una inmunoglobulina que comprende un marco humano, al menos una, y preferiblemente la totalidad de las regiones de determinación de la complementariedad (CDRs) procedentes de un anticuerpo no humano, y en el cual cualquier región constante que se encuentre presente es sustancialmente idéntica a una región constante de la inmunoglobulina humana, es decir, idéntica al menos en torno al 85-90%, y preferiblemente idéntica al menos en un 95%. Por ello, todos los componentes de una inmunoglobulina humanizada, salvo, posiblemente, las CDRs, son sustancialmente idénticos a los correspondientes elementos de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativa. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (atente estadounidense N° 4.816.567), en los cuales una parte sustancialmente inferior a un dominio variable humano intacto ha sido sustituida por la correspondiente secuencia procedente de una especie no humana. Frecuentemente, los residuos de marco de las regiones de marco humanas serán sustituidos por el correspondiente residuo procedente del anticuerpo donante de la CDR a fin de alterar, y preferiblemente mejorar, los enlaces de antígenos. Estas sustituciones del marco se identifican a través de métodos que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, modelando las interacciones de la CDR y los residuos del marco a fin de identificar aquellos residuos de marco que resulten importantes para el enlace de antígeno y la comparación de secuencias de identificación de residuos de marco poco corrientes en posiciones específicas. Véase, por ejemplo, Queen et al., Patentes estadounidenses Nos.: 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 6.180.370. Los anticuerpos pueden humanizarse utilizando diversas técnicas conocidas en el sector, por ejemplo, los injertos CDR (EP 239.400; Publicación PCT WO 91/09967; Patentes estadounidenses Nos. 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), chapado o revestimiento superficial (EP 592.106; BP 519.596; Padlan, Mol. Immunol., 28:489-498 (1991); Studnicka et al., Prot. Eng. 7:805-814 (1994); Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973 (1994), y transposiciones en cadena (patente estadounidense No. 5.565.332).

[0042] Pueden resultar deseables los anticuerpos completamente 'humanos' para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden fabricarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo los métodos “phage display” descritos anteriormente, utilizando librerías de anticuerpos obtenidas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse las patentes estadounidenses Nos. 4.444.887 and 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741. Los anticuerpos humanos también pueden producirse utilizando ratones transgénicos, que no son capaces de expresar las inmunoglobulinas funcionales endógenas, pero que pueden expresar los genes de la inmunoglobulina humana. Puede verse un resumen de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos en Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995). Si se desea conocer una discusión más detallada de esta tecnología de obtención de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos, así como los protocolos para la obtención de dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; La patente europea N° 0598877; las patentes estadounidenses Nos. 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, algunas empresas, como Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y Medarex (Princeton, NJ) pueden ocuparse de facilitar anticuerpos humanos dirigidos a un antígeno seleccionado, utilizando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

[0043] Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítopo seleccionado pueden generarse utilizando una técnica denominada “selección guiada.” Con este método, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce al mismo epítopo (Jespersen et al., Biotechnology 12: 899-903 (1988)).

[0044] El “epítopo” o “determinante antigénico” hace referencia al lugar de un antígeno al que se une un anticuerpo. Los epítopos pueden formarse tanto a través de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el pliegue terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos suelen conservarse al exponerse a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados mediante pliegue terciario suelen perderse cuando se tratan con disolventes desnaturizantes. Por lo general, un epítopo contiene al menos 3, y más normalmente, al menos 5 o de 8 a 10 aminoácidos en una conformación espacial singular. Entre los métodos utilizados para determinar la conformación espacial de los epítopos se encuentran, por ejemplo, la cristalografía por rayos x y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epítopo Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

[0045] Anticuerpos de la “clase IgG” hace referencia a los anticuerpos de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. La numeración de los residuos de aminoácido en las cadenas pesadas y ligeras es la del índice de la UE (Kabat, et al., “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5th ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991); en este caso se ha utilizado el sistema de numeración de la UE).

[0046] De acuerdo con la presente solicitud, el término “GPR64” se refiere al ácido nucleico, y a las variantes polimórficas, alelos, mutantes y homólogos interespecies del ácido nucleico y del polipéptido que (1) tienen una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia del nucleótido superior al 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o más preferiblemente, una identidad de secuencia de nucleótido del 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98% o 99% o superior, preferiblemente a lo largo de una región de al menos 25, 50, 100, 200, 500, 1000, o más nucleótidos, a una secuencia de nucleótido de SEQ ID NO:1; (2) se unen a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales, utilizados contra un inmunogen que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido de SEQ ID NO: 1, y variantes de la misma codificadas de forma conservadora; (3) hibridan específicamente en condiciones de hibridación restrictivas formando una secuencia de ácido nucleico, o el complemento de la misma de SEQ ID NO: 1 y variantes de la misma modificadas de forma conservadora; o (4) tienen una secuencia de aminoácido con una identidad de secuencia de aminoácido superior al 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 95%, 90%, preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácido del 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o superior, preferiblemente a lo largo de una región de al menos en torno a 25, 50, 100, 200, o más, con una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:2. Una secuencia de polinucleótido o polipéptido procede normalmente de un mamífero, incluyendo, sin limitación, primates, por ejemplo, humanos; roedores; por ejemplo, ratas, ratones, hámsters, vacas, cerdos, caballos, ovejas u otros mamíferos. Un "polipéptido GPR64" y un "polinucleótido GPR64" incluyen sus formas naturales o recombinantes.

[0047] Una proteína o ácido nucleico GPR64 de "longitud completa" se refiere a una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos de cáncer de ovario, o una variante de la misma, que contiene todos los elementos que normalmente se encuentran en una o más secuencias de polinucleótidos o polipéptidos GPR64 naturales o salvajes. Por ejemplo, un ácido nucleico GPR64 de longitud completa comprenderá normalmente todos los exones que codifican la proteína natural de longitud completa. La "longitud completa" puede ser anterior o posterior a diversas etapas de procesamiento o empalme posterior a la traducción, incluyendo empalmes alternativos.

[0048] "Muestra biológica", tal y como se utiliza en este documento, es una muestra de tejido biológico o fluido que contiene ácidos nucleicos o polipéptidos, por ejemplo, de una proteína GPR64, un polinucleótido o transcripción. Dichas muestras incluyen, sin limitación, tejidos aislados de primates (por ejemplo, humanos), o de roedores (por ejemplo, ratones y ratas). Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos, como muestras de biopsias y autopsias, secciones congeladas tomadas con fines histológicos, sangre, plasma, suero, esputos, heces, lágrimas, mucosidad, pelo, piel, etc. Las muestras biológicas también pueden incluir explantes y cultivos celulares primarios y/transformados obtenidos de tejidos de pacientes. Una muestra biológica suele obtenerse a partir de un organismo eucariótico, más preferiblemente de un mamífero, como un primate, por ejemplo, un chimpancé o un humano; vacas, perros, gatos; un roedor, por ejemplo, una cobaya, rata o ratón; conejo; pájaro; reptil o pez.

[0049] "Proporcionar una muestra biológica" significa obtener una muestra biológica para utilizarse con los métodos que se describen en la presente invención. Con frecuencia, esto se lleva a cabo extrayendo una muestra de células de un animal, pero también puede realizarse utilizando células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otra ocasión y/o con otra finalidad), o poniendo en práctica los métodos de la invención. Los tejidos procedentes de archivos, con un historial de tratamientos o resultados, resultarán especialmente útiles.

[0050] Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma o que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácido o nucleótidos que son el mismo (es decir, una identidad del 60% preferiblemente una identidad del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o superior en una región especificada, cuando se compara y alinea para una correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación o región designada) medido utilizando unos algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros predefinidos que se describen a continuación, o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, la página web de NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> o similares). En ese caso, se dice que dichas secuencias son "sustancialmente idénticas". Esta definición también se refiere, o puede aplicarse, al complemento de una secuencia de comprobación. Esta definición también se refiere o se puede aplicar al complemento de una secuencia de comprobación. La definición incluye también secuencias con fragmentos eliminados y/o añadidos, así como aquellas que tienen sustituciones, y las que se producen de forma natural, por ejemplo, las variantes polimórficas o alélicas, y las variantes artificiales. Tal y como se describe seguidamente, los algoritmos preferidos pueden tener en cuenta las carencias y similares. Preferiblemente se da una identidad en una región cuya longitud es de al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos, o más preferiblemente, en una región cuya longitud es de 50-100 aminoácidos o nucleótidos.

[0051] Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de comprobación. Cuando se utiliza un algoritmo de comprobación de secuencia, se introducen en un ordenador las secuencias de comprobación y de referencia, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si fuese necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de la secuencia. Preferiblemente pueden utilizarse los parámetros predeterminados del programa, si bien pueden designarse unos parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia de las secuencias de comprobación con respecto a la secuencia de referencia, en función de los parámetros de programa.

[0052] Una "ventana de comparación", tal y como se utiliza en el presente documento, incluye las referencias a un segmento de una de las diversas posiciones contiguas seleccionadas entre el grupo que normalmente consiste de 20 a 600, por lo general de unas 50 a unas 200, y más habitualmente de unas 100 a unas 150, en las que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia con el mismo número de posiciones contiguas, una

vez que las dos secuencias se han alineado de forma óptima. Los métodos de alineación de secuencias para proceder a su comparación se conocen perfectamente en la técnica. La alineación óptima de las secuencias, para proceder a su comparación, puede ser llevada a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), a través del método de búsqueda de similitudes de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA, en el paquete de software de Genética de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante la alineación manual y la inspección visual (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. Suplemento 1995)).

[0053] Entre los ejemplos preferidos de algoritmos adecuados para la determinación de la identidad de la secuencia de porcentaje y la similitud de la secuencia destacan los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1977) y Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). BLAST y BLAST 2.0 se utilizan, con los parámetros que aquí se describen, para determinar el porcentaje de identidad de la secuencia correspondiente a los ácidos nucleicos y proteínas de la invención. El software utilizado para la realización de los análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica en primer lugar la identificación de pares de secuencias con una elevada puntuación (HSPs) mediante la identificación de palabras cortas con una longitud W en la secuencia de consulta, y coincidan con, o satisfagan, un umbral de puntuación positivo T al alinearse con una palabra de la misma longitud en una secuencia de una base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabra de vecindario (Altschul et al., supra). Estas coincidencias con la palabra de vecindario inicial actúan como semilla para iniciar búsquedas a fin de encontrar HSPs de mayor longitud que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia, siempre que pueda aumentarse la puntuación de alineación acumulada. Las puntuaciones acumulativas se calculan utilizando, por ejemplo, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación positiva obtenida para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación negativa obtenida para residuos no coincidentes; siempre < 0). En el caso de las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuaciones para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las coincidencias de palabras en ambas direcciones se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada se aleja en una cantidad X del máximo valor alcanzado; la puntuación acumulada cae a cero o por debajo de este nivel, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntuación negativa; o se alcanza el final de cada una de la secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. En el caso de las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como parámetros predeterminados una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)) unas alineaciones (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas.

[0054] El algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de las similitudes existentes entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma menor (P(N)), que proporciona un indicio de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos sucedería por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,2, más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,01 y más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,001. Los valores de registro pueden ser grandes números negativos, por ejemplo, 5, 10, 20, 30, 40, 40, 70, 90, 110, 150, 170, etc.

[0055] Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico presenta desde el punto de vista inmunológico una reactividad cruzada con los anticuerpos surgidos contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe seguidamente. De este modo, un polipéptido, por lo general, suele ser sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos se diferencian tan sólo por las sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones restrictivas, como se describe más adelante. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que pueden utilizarse los mismos imprimadores para amplificar las secuencias.

[0056] Una "célula receptora" es una célula natural o transformada que contiene un vector de expresión y soporta la replicación o expresión del vector de expresión. Las células receptoras pueden ser células cultivadas, explantes, células in vivo, y similares. Las células receptoras pueden ser células procarióticas, como el E. coli, o células eucarióticas, como células procedentes de la levadura, insectos, anfibios o mamíferos, como CHO, HeLa, y similares (véase, por ejemplo, el catálogo de la American Type Culture Collection o su página web, www.atcc.org).

[0057] Los términos "aislado", "purificado" o "biólogicamente puro" se refieren a aquel material que está sustancialmente o esencialmente libre de los componentes que lo acompañan cuando se encuentra en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad suelen determinarse recurriendo a técnicas de química analítica, como la

electroforesis con gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína o ácido nucleico que sea la especie predominante presente en una preparación se encuentra sustancialmente purificado. Concretamente, un ácido nucleico aislado se separa algunos marcos de lectura abiertos que flanquean de forma natural al gen y codifican proteínas diferentes de la proteína codificada por el gen. El término “purificado”, en algunas realizaciones, quiere decir que un ácido nucleico o proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético. Preferiblemente, significa que el ácido nucleico o proteína es puro al menos en un 85%, y más preferiblemente, puro en al menos un 95%, y más preferiblemente, puro en al menos un 99%. “Purificar” o “purificación”, en otras realizaciones, significa eliminar al menos un contaminante de la composición que va a purificarse. En este sentido, la purificación no requiere que el componente purificado sea homogéneo, por ejemplo, 100% puro.

[0058] Los términos “polipéptido,” “péptido” y “proteína” se utilizan indistintamente en este documento, y se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos son de aplicación a los polímeros de aminoácido en los que uno o más residuos de aminoácido es un mimético químico artificial del correspondiente aminoácido natural, así como a polímeros de aminoácido naturales, los que contienen residuos modificados y los polímeros de aminoácidos no naturales.

[0059] El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a la de los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que son modificados posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que poseen la misma estructura química básica que los aminoácidos naturales, por ejemplo, un carbono α unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina-sulfóxido, metionina metil sulfonio. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras moleculares de péptidos modificados, pero conservan la misma estructura química básica de un aminoácido natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que poseen una estructura diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de forma similar a la de un aminoácido natural.

[0060] En el presente documento se puede hacer referencia a los aminoácidos denominándolos por sus símbolos de tres letras normalmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Igualmente, puede hacerse referencia a los nucleótidos a través de sus códigos de una sola letra normalmente aceptados.

[0061] El término “variantes modificadas de forma conservadora” se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de ácidos nucleicos. En lo que respecta a las secuencias específicas de ácidos nucleicos, variantes modificadas de forma conservadora se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácido, a las secuencias esencialmente idénticas o asociadas, por ejemplo, las secuencias naturalmente contiguas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de las proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos ellos el aminoácido alanina. De este modo, en cada una de las posiciones en las que una alanina está especificada con un codón, el codón se puede alterar para pasar a ser otro de los codones correspondientes descritos sin que se altere el polipéptido codificado. Dichas variaciones del ácido nucleico se denominan “variaciones silentes”, que constituyen una especie de variaciones modificadas de forma conservadora. Cada una de las secuencias de ácido nucleico del presente documento que codifica un polipéptido también describe variaciones silentes del ácido nucleico. Cualquier persona versada en la materia reconocerá que, en ciertos contextos, todos los codones de un ácido nucleico (a excepción de AUG, que normalmente es el único codón de la metiotina, y TGG, que normalmente es el único codón del triptófano) pueden modificarse para obtener una molécula funcionalmente idéntica. De este modo, y con frecuencia, las variaciones silentes de un ácido nucleico que codifica un polipéptido se encuentran implícitas en una secuencia descrita con respecto al producto de la expresión, pero no con respecto a las secuencias de sondeo reales.

[0062] En lo que se refiere a las secuencias de aminoácidos, cualquier persona versada en la materia se dará cuenta de que las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido, o proteína que altere, añada o elimine un solo aminoácido o un reducido porcentaje de aminoácidos de la secuencia modificada es una “variante modificada de forma conservadora” cuando la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos con una funcionalidad similar son bien conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas de forma conservadora deben añadirse, pero de forma no excluyente, a las variantes polimórficas, a los homólogos interespecies y a los alelos de la invención. Las sustituciones típicamente conservadoras de un producto por otro incluyen, por ejemplo, 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido Glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteínas (1984)).

[0063] Las estructuras macromoleculares, como las estructuras de polipéptidos, pueden describirse en términos de diversos niveles de organización. Para una discusión general acerca de dicha organización, véase, por ejemplo, Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell* (3rd ed., 1994) y Cantor & Schimmel, *Biophysical Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecules* (1980). “Estructura primaria” se refiere a la secuencia del aminoácido de un péptido específico. “Estructura secundaria” se refiere a estructuras tridimensionales localmente ordenadas que se encuentran en un polipéptido. Estas estructuras se conocen normalmente como dominios. Los dominios son porciones de un polipéptido que a menudo forman parte de una unidad compacta del polipéptido y que normalmente tienen una longitud que varía entre 25 y aproximadamente 500 aminoácidos. Los dominios típicos están constituidos por secciones con una organización más reducida, como las contracciones de (-sheet y (-helices. “Estructura terciaria” se refiere a la estructura tridimensional completa de un monómero de un polipéptido. “Estructura cuaternaria” se refiere a la estructura tridimensional que normalmente está formada por la asociación no covalente de unidades terciarias independientes. Los términos anisotrópicos son también conocidos como términos energéticos.

[0064] Una “etiqueta” o un “grupo detectable” es una composición detectable a través de medios físicos espectroscópicos, bioquímicos, fotoquímicos, inmuoquímicos, químicos o de otro tipo. Por ejemplo, las etiquetas más útiles incluyen tintes fluorescentes, reactivos con gran densidad de electrones, enzimas (por ejemplo, las normalmente utilizadas en un test ELISA), biotina, digoxigenina, oro coloidal, nanocristales luminiscentes (por ejemplo, puntos cuánticos), haptenos y proteínas u otras entidades que puedan convertirse en detectables, por ejemplo, mediante la incorporación de una radioetiqueta en el péptido o utilizarse para detectar anticuerpos específicamente reactivos al péptido. El radioisótopo puede ser, por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I . En algunos casos, sobre todo cuando se utilizan los anticuerpos que actúan contra las proteínas de la invención, los radioisótopos se utilizan como grupos tóxicos, como se describe seguidamente. Las etiquetas pueden incorporarse a los ácidos nucleicos de la GPR64, proteínas y anticuerpos en cualquier posición. Puede utilizarse cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo a la etiqueta, incluyendo los métodos descritos por Hunter et al., *Nature*, 144:945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13:1014 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40:219 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30:407 (1982). La vida útil de los péptidos radioetiquetados o de las composiciones de anticuerpos radioetiquetados puede ampliarse añadiendo sustancias que estabilicen el péptido o anticuerpo radioetiquetado y lo protejan frente a la degradación. Puede utilizarse cualquier sustancia o combinación de sustancias que establezca el péptido o anticuerpo radioetiquetado, incluyendo las sustancias que se describen en la patente estadounidense N° 5.961.955.

[0065] Un “efector” o “grupo efector” o “componente efector” es una molécula unida (o enlazada, o conjugada), bien de forma covalente, mediante un enlazador o un enlace químico, o de forma no covalente, a través de enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos, o enlaces de hidrógeno, a un anticuerpo. El “efector” puede consistir en diversas moléculas, incluyendo, por ejemplo, grupos de detección que incluyen compuestos radioactivos, compuestos fluorescentes, una enzima o sustrato, etiquetas como etiquetas de epitopes, una toxina, grupos activables, un agente quimioterapéutico o citotóxico, un quimioattractor, una lipasa; un antibiótico; o un radioisótopo que emita radiaciones “duras” por ejemplo, radiación beta.

[0066] El término “agente citotóxico”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o impide el funcionamiento de las células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos y toxinas como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

[0067] Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico que resulta útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos destacan la adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracil, citosina arabinósido (“Ara-C”), ciclofosfamida, tiotepa, busulfan, citosina, taxoides, por ejemplo, paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), y docetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Rnace), toxotere, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatina, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (Véase la patente estadounidense N° 4,675,187), 5-FU, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, actinomicina D, VP-16, clorambucil, melfalán, y otras mostazas nitrogenadas relacionadas. También se incluyen en esta definición los agentes hormonales que actúan regulando o impidiendo la acción hormonal en tumores, como el tamoxifen y la onapristona.

[0068] “Portadores”, según se utiliza en el presente documento, incluye portadores farmacológicamente aceptables, excipientes o estabilizadores no tóxicos para la célula o el mamífero expuestos a los mismos, a las dosis y concentraciones utilizadas. Frecuentemente, el portador fisiológicamente aceptable es una solución tampón con pH acuoso. Entre los ejemplos de los portadores fisiológicamente aceptables se encuentran las soluciones tampón como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a unos 10 residuos); proteínas, como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como la polivinilpirrolidona; aminoácidos como la glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, como EDTA; alcoholes del azúcar, como el manitol o el sorbitol; contra-iones para la formación de sales, como el sodio; y/o agentes tensioactivos no iónicos, como el glicol de polietileno TWEEN (PEG), y PLURONICS.

[0069] Una “cantidad terapéuticamente efectiva”, en referencia al tratamiento de un tumor, se refiere a una cantidad capaz de producir uno o más de los efectos siguientes: (1) inhibición, en determinada medida, del crecimiento tumoral, incluyendo la ralentización y la detención total del crecimiento; (2) reducción del número de células tumorales; (3) reducción del tamaño del tumor; (4) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de células tumorales en órganos periféricos; (5) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la metástasis; (6) mejora de la respuesta inmune anti-tumoral, que puede, pero no obligatoriamente, tener como resultado la regresión o el rechazo del tumor; y/o (7) alivio, en determinada medida, de uno o más síntomas asociados a la enfermedad. Una “cantidad terapéuticamente efectiva” de un anticuerpo GPR64, a los efectos del tratamiento de un tumor, pueden determinarse empíricamente y de forma rutinaria.

[0070] “Tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico y profiláctico como a las medidas preventivas. Entre los pacientes que precisan tratamiento se incluyen los que ya tienen la enfermedad, así como aquellos en los que se quiere prevenir dicha enfermedad.

[0071] El término “recombinante”, cuando se utiliza haciendo referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que dicha célula, ácido nucleico, proteína o vector, se han modificado mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativo, o que la célula se ha obtenido a partir de una célula modificada de esta forma. De este modo, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos que en otras condiciones se expresarían de forma anormal, estarían infraexpresados o no estarían expresados en absoluto. Mediante el término “ácido nucleico recombinante” se denomina en este documento al ácido nucleico, originalmente formado in vitro, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, utilizando polimerasas y endonucleasas, en una forma que normalmente no se encuentra en la naturaleza. De este modo, se consigue un enlace funcional de las diferentes secuencias. Así pues, un ácido nucleico aislado, en forma lineal, o un vector de expresión formado in vitro ligando moléculas de ADN que normalmente no están unidas, se consideran ambos recombinantes a los efectos de esta invención. Se entiende que una vez que se ha obtenido un ácido nucleico recombinante y se ha reintroducido en una célula u organismo anfitrión, se replicará de forma no recombinante, es decir, utilizando la maquinaria celular in vivo de la célula receptora, en lugar de las manipulaciones in vitro; no obstante, dichos ácidos nucleicos, una vez producidos de forma no recombinante, aunque se repliquen posteriormente de forma no recombinante, deben seguir siendo considerados recombinantes a los efectos de la invención. Del mismo modo, una “proteína recombinante” es una proteína obtenida utilizando técnicas recombinantes, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante, como se ha indicado anteriormente.

[0072] El término “heterólogo” cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que normalmente no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce normalmente de forma recombinante, con dos o más secuencias, por ejemplo, a partir de genes no relacionados configurados para obtener un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor procedente de una fuente y una región de codificación procedente de otra fuente. Del mismo modo, una proteína heteróloga hará referencia frecuentemente a dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

[0073] Un “promotor” se define como una matriz de secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Tal y como se utiliza en este documento, un promotor incluye las necesarias secuencias de ácido nucleico que se encuentran cerca del emplazamiento inicial de la transcripción, como, en el caso de un promotor del tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos distales favorecedores o represores, que pueden encontrarse a varios miles de pares de base del emplazamiento inicial de la transcripción. Un promotor “constitutivo” es un promotor que se encuentra activo en la mayoría de condiciones medioambientales y de desarrollo. Un promotor “inducible” es un promotor que se encuentra activo bajo regulación medioambiental o de desarrollo. El término “unido operativamente” se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión del ácido nucleico (como un promotor, o matriz de emplazamientos de unión del factor de transmisión) y una segunda secuencia de ácido nucleico, donde la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

[0074] Un “vector de expresión” es un constructo de ácido nucleico, generado de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos especificados de ácido nucleico que permiten la transcripción de un ácido nucleico específico en una célula receptora. El vector de expresión puede formar parte de un plásmido, de un virus o de un fragmento de ácido nucleico. Normalmente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que se transcribe operativamente enlazado a un promotor.

[0075] La frase “se une específicamente (o selectivamente)” a un anticuerpo o “es específicamente (o selectivamente) inmunoreactivo con” cuando se hace referencia a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína, en una población heterogénea de proteínas y otros elementos biológicos. De este modo, en las condiciones designadas del inmunoensayo, los anticuerpos especificados se unen a unas secuencias de proteína específicas al menos dos veces en segundo plano, y más normalmente, más de 10 a 100 veces en segundo plano.

[0076] La unión específica a un anticuerpo en dichas condiciones requiere un anticuerpo seleccionado por su especificidad para una proteína concreta. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales que reaccionan a una proteína específica, variantes polimórficas, alelos, ortólogos y variantes modificadas de forma conservadora, variantes empalmadas, o porciones de la misma, pueden seleccionarse de forma que tan sólo se obtengan aquellos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos a la GPR64 y no a otras proteínas. Esta selección puede conseguirse sustrayendo anticuerpos que presentan una reactividad cruzada con otras moléculas. Pueden utilizarse diversos inmunoensayos para la selección de anticuerpos que sean específicamente inmunorreactivos a una proteína específica. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA de fase sólida se utilizan habitualmente para seleccionar anticuerpos que sean específicamente inmunorreactivos a una proteína (véase, por ejemplo, en Harlow & Lane, Anticuerpos, A Laboratory Manual (1988) una descripción de los formatos y condiciones del inmunoensayo que pueden utilizarse para determinar la inmunorreactividad específica).

[0077] Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen una condición fisiológica de los mamíferos que se caracteriza típicamente por el crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos del cáncer se encuentran, sin limitación, el carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y la leucemia. Entre los ejemplos más específicos de dichos cánceres se encuentran los cánceres comunes, como el cáncer de próstata, el cáncer de colon, el carcinoma de células escamosas, el cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer colorrectal, carcinoma del endometrio, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

[0078] “Tumor”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a todo tipo de crecimiento y proliferación celular de origen neoplásico, tanto si es maligno o benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.

Expresión de los polipéptidos de la GPR64 procedentes de ácidos nucleicos

[0079] Los ácidos nucleicos de la invención se pueden utilizar para producir diversos vectores de expresión que expresan polipéptidos de la GPR64 y que pueden utilizarse para obtener los anticuerpos de la invención, como se describe más adelante. Los vectores de expresión y la tecnología del ADN recombinante resultan perfectamente conocidos para las personas versadas en la materia, y se utilizan para expresar proteínas. Los vectores de expresión pueden ser vectores extracromosómicos auto-replicantes o vectores que se integran en un genoma receptor. Por lo general, estos vectores de expresión incluyen ácidos nucleicos reguladores transcripcionales y traslacionales enlazados operativamente al ácido nucleico que codifica la proteína GPR64. El término “secuencias de control” se refiere a las secuencias de ADN que se utilizan para la expresión de una secuencia de codificación enlazada operativamente en un organismo receptor específico. Las secuencias de control que resultan adecuadas para los procariotes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador y un emplazamiento de enlace de ribosomas. Se sabe que las células eucarióticas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0080] El ácido nucleico se encuentra “operativamente enlazado” cuando se encuentra en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia previa o secuencia líder secretora se encuentra operativamente enlazado al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se encuentra operativamente enlazado a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un emplazamiento de enlace de ribosoma se encuentra operativamente enlazado a una secuencia de codificación si se encuentra situado de forma que facilite la traslación. En general, “enlazado operativamente” significa que las secuencias de ADN que se están enlazando son contiguas, y en el caso de una secuencia líder secretora, contigua y en fase de lectura. No obstante, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. Los enlaces se consiguen normalmente mediante ligado en los emplazamientos de restricción más adecuados. Si dichos emplazamientos no existen, se utilizarán adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional. Los ácidos nucleicos reguladores transcripcionales y traslacionales serán por lo general adecuados para la célula receptora utilizada para la expresión de la proteína GPR64. En la técnica se conocen numerosos tipos de vectores de expresión adecuados, así como secuencias reguladoras apropiadas para una serie de células receptoras.

[0081] En general, las secuencias reguladoras transcripcionales y traslacionales pueden incluir, sin limitación, secuencias promotoras, emplazamientos de enlace ribosomales, secuencias transcripcionales de inicio y fin, secuencias traslacionales de principio y fin, y secuencias potenciadoras o activadoras. En algunos casos, las secuencias reguladoras incluyen un promotor y secuencias transcripcionales de principio y fin.

[0082] Las secuencias promocionales incluyen promotores constitutivos o inducibles. Los promotores pueden ser promotores naturales o promotores híbridos. Los promotores híbridos, que combinan elementos de más de un promotor, son también conocidos en la técnica y resultan útiles para la presente invención.

[0083] Además, un vector de expresión puede comprender elementos adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación, permitiendo de este modo su mantenimiento en dos organismos,

por ejemplo, células de mamíferos o de insectos para su replicación, conteniendo el vector de expresión al menos una secuencia homóloga del genoma de la célula receptora, y preferiblemente dos secuencias homólogas que flanquean el constructo de expresión. El vector de integración puede estar dirigido a un locus específico de la célula receptora, seleccionando la adecuada secuencia homóloga para su inclusión en el vector. Los constructos para la integración de vectores son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, Fernández & Hoeffler, supra).

[0084] Asimismo, el vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable que permita la selección de células receptoras transformadas. Os genes de selección son perfectamente conocidos en la técnica, y varían en función de la célula receptora utilizada.

[0085] La presente solicitud muestra asimismo que las proteínas GPR64 de la presente invención se producen cultivando una célula receptora transformada con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína GPR64, bajo unas condiciones adecuadas que induzcan o causen la expresión de la proteína GPR64. Las condiciones adecuadas para la expresión de la proteína GPR64 variarán en función del vector de expresión y de la célula receptora, y podrán ser evaluadas fácilmente por cualquier experto en la materia mediante experimentación u optimización de rutinas. Por ejemplo, la utilización de promotores constitutivos en el vector de expresión requerirá la optimización del crecimiento y la proliferación de la célula receptora, mientras que la utilización de un promotor inducible requerirá las condiciones de crecimiento adecuadas para la inducción. Igualmente, también es importante el momento de la cosecha. Por ejemplo, los sistemas béculovirales utilizados en la expresión de células de insectos son virus líticos, por lo que la selección del momento de la cosecha puede resultar crítico para el rendimiento del producto.

[0086] Entre las células apropiadas se encuentran las levaduras, bacterias, arqueobacterias, hongos y células animales de insectos, incluyendo células de mamíferos. Resultan especialmente adecuadas la *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras, la bacteria *E. coli*, *Bacillus subtilis*, las células Sf9, células C129, las células 293, las Neurosporas, las células BHK, CHO, COS, HeLa cells, HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana), las células THP1 (una línea celular macrófaga) y otras diversas células y líneas celulares humanas.

[0087] Las proteínas GPR64 de la presente invención pueden expresarse en células de mamíferos. Los sistemas de expresión en mamíferos también son conocidos en la técnica, e incluyen sistemas retrovirales y adenovirales. Un sistema de vector de expresión es un sistema vector retroviral como el que se describe en general en W097272 12 y W097272 13. Como promotores mamíferos especialmente utilizados se encuentran los promotores de genes víricos de mamíferos, ya que los genes víricos suelen tener una elevada expresión y una amplia gama de receptores. Entre los ejemplos destacan el promotor temprano SV40, el virus promotor del tumor mamario del ratón LTR, el promotor principal tardío del adenovirus, el promotor del virus del herpes simplex, y el promotor del CMV (véase, por ejemplo, Fernández & Hoeffler, supra). Normalmente, las secuencias de poliadenilación y de finalización de la transcripción reconocidas por las células de mamíferos son regiones reguladoras situadas en 3' con respecto al codón de parada de la traslación, por lo que, junto con los elementos promotores, flanquean la secuencia de codificación. Entre los ejemplos de señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación se encuentran las derivadas de SV40.

[0088] Los métodos de introducción de ácido nucleico exógeno en receptores mamíferos, así como otros receptores, son bien conocidos en la técnica, variando en función del receptor utilizado. Entre dichas técnicas se encuentra la transfección mediada por dextrina, la precipitación de fosfato cálcico, la transfección mediada por polibreno, la fusión del protoplasto, la electroporación, la infección vírica, la encapsulación de los polinucleótidos en liposomas y la microinyección directa del ADN en los núcleos.

[0089] Las proteínas GPR64 de la presente invención pueden expresarse en sistemas bacteriales. Los sistemas de expresión bacteriales son bien conocidos en la técnica. También son conocidos y pueden utilizarse los promotores procedentes de bacteriófagos. Además, los promotores sintéticos y los promotores híbridos también resultan útiles; por ejemplo, el promotor *tac* es un híbrido de las secuencias de promotores *trp* y *lac*. Asimismo, un promotor bacterial puede incluir promotores naturales con origen no bacteriano que tengan la capacidad de unirse a la polimerasa del ARN bacteriano e iniciar la transcripción. Además de una secuencia operativa de promotor, sería deseable un emplazamiento de enlace del ribosoma eficiente. El vector de expresión también puede incluir un péptido de señal que permita la secreción de la proteína GPR64 en bacterias. La proteína se secreta en el medio de crecimiento (bacterias gram-positivas) o en el espacio periplásmico, situado entre las membranas interior y exterior de la célula (bacterias gram-negativas). El vector de expresión bacteriana también puede incluir un marcador seleccionable que permita la selección de cepas bacterianas transformadas. Entre los genes adecuados para su selección se encuentran los genes que hacen que las bacterias sean resistentes a los fármacos como la ampicilina, el cloranfenicol, la eritromicina, canamicina, neomicina y tetraciclina. Los marcadores seleccionables incluyen genes biosintéticos, como los de las vías biosintéticas de la histidina, el triptófano y la leucina. Estos componentes se ensamblan en vectores de expresión. Los vectores de expresión correspondientes a las bacterias son bien conocidos en la técnica, e incluyen los vectores del *Bacillus subtilis*, *B. coli*, *Streptococcus cremoris*, y *Streptococcus lividans*, entre otros. Los vectores de expresión bacteriana se transforman en células receptoras bacterianas utilizando técnicas bien conocidas en la industria, como el tratamiento con cloruro cálcico, la electroporación y otras.

[0090] Los polipéptidos GPR64 de la presente invención pueden producirse en células de insectos. Los vectores de expresión para la transformación de las células de insectos y, concretamente, los vectores de expresión basados en báculo virus son bien conocidos en la técnica.

[0091] Los polipéptidos de la GPR64 también pueden producirse en células de levadura. Los sistemas de expresión de las levaduras son bien conocidos en la técnica, e incluyen vectores de expresión de la *Saccharomyces cerevisiae*, la *Candida albicans* y la *C. maltosa*, la *Hansenula polymorpha*, la *Kluyveromyces fragilis* y la *K. lactas*, la *Pichia guilliermondii* y la *P. pastoris*, la *Schizosaccharomyces pombe*, y la *Yarrowia lipolytica*.

[0092] Los polipéptidos de la GPR64 también pueden producirse como una proteína de fusión, utilizando técnicas bien conocidas en el sector. De este modo, por ejemplo, para la creación de anticuerpos monoclonales, si el epítopo deseado es pequeño, la proteína GPR64 puede fusionarse para crear una proteína portadora, para formar un inmunogen. Alternativamente, la proteína GPR64 puede producirse como una proteína de fusión para incrementar la expresión o por otras razones. Por ejemplo, cuando la proteína GPR64 es un péptido de la GPR64, el ácido nucleico que codifica el péptido puede estar unido a otro ácido nucleico con fines de expresión.

[0093] Normalmente, los polipéptidos de la GPR64 se purifican o se aíslan con posterioridad a la expresión. Las proteínas de la GPR64 pueden aislarse o purificarse de diversos modos conocidos por las personas versadas en la materia en función de qué otros componentes se encuentran presentes en la muestra. Los métodos estándar de purificación incluyen técnicas electroforéticas, moleculares, inmunológicas y cromatográficas, incluyendo la cromatografía HPLC de intercambio iónico, de interacción hidrofóbica, de afinidad y de fase inversa, y el cromatofoco. Por ejemplo, la proteína GPR64 se puede purificar utilizando una columna estándar del anticuerpo anti-proteína GPR64. Las técnicas de ultrafiltrado y diafiltrado, en conjunción con la conjunción proteínica, también resultan útiles. Para obtener una orientación general relativa a las técnicas de purificación más adecuadas, véase Scopes, *Protein Purification* (1982). El grado de purificación necesario variará en función de la utilización de la proteína GPR64. En determinados casos no será necesaria la purificación.

[0094] Una persona versada en la materia observará que la proteína expresada no precisa tener la secuencia GPR64 natural, sino que puede ser un derivado o variante, en comparación con la secuencia natural. Por lo general, estas variantes se encuadran en una o más de las tres clases siguientes: variante sustitucional, insercional o deletional. Normalmente, estas variantes se preparan mediante mutagénesis de los nucleótidos específica del emplazamiento en el ADN que codifica la proteína, utilizando una mutagénesis por inserción de un casete o PCR, u otras técnicas bien conocidas en la técnica, para producir el ADN que codifica la variante, y posteriormente expresar el ADN en un cultivo celular recombinante como el anteriormente descrito. No obstante, se pueden preparar variantes de fragmentos de proteína con aproximadamente hasta 100-150 residuos mediante síntesis *in Vitro*, utilizando técnicas conocidas. Las variantes de la secuencia de aminoácido se caracterizan por el carácter predeterminado de la variación, una característica que las diferencia de las variaciones naturales alélicas o interespecies de la secuencia del aminoácido de la proteína GPR64. Normalmente, las variantes presentan la misma actividad biológica cualitativa que el análogo natural, aunque también pueden seleccionarse variantes que presenten características modificadas, como se describirá en mayor detalle más adelante.

[0095] Los polipéptidos de la GPR64 también pueden modificarse de modo que formen moléculas quiméricas que comprendan un polipéptido de la GPR64 fusionado con otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácido, donde dicha molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido de la GPR64 con una etiqueta de polipéptido que proporciona un epítopo al cual puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-tag. La etiqueta epítopo se suele situar en el extremo amino-o carboxyl del polipéptido de la GPR64. La presencia de dichas formas etiquetadas como epítopo de un polipéptido de la GPR64 puede detectarse utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiquetado. Asimismo, la provisión de la etiqueta del epítopo permite que el polipéptido de la GPR64 se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se enlace a la etiqueta epítopo. Alternativamente, la molécula quimérica puede comprender una fusión de un polipéptido de la GPR64 con una inmunoglobulina o una región específica de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica, dicha fusión podría ser con la región Fc de una molécula IgG.

[0096] En la industria se conocen diversas etiquetas de polipéptido y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen las etiquetas polihistidina (poly-his) or poli-histidina-glicano (poly-his-gli); HIS6 y etiquetas de quelación metálica, el polipéptido marcador HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field et al., *Mol. Cell. Biol.* 8:2159-2165 (1988)); el marcador c-myc y los anticuerpos del mismo 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 (Evan et al., *Molecular and Cellular Biology* 5:3610-3616 (1985)); y el marcador de la glicoproteína D del virus herpes simple (gD) y su anticuerpo (Paborsky et al., *Protein Engineering* 3(6):547-553 (1990)). Otros polipéptidos marcadores incluyen el péptido FLAG (Hopp et al., *BioTechnology* 6:1204-1210 (1988)); el péptido del epítopo de KT3 (Martin et al., *Science* 255:192-194 (1992)); el péptido del epítopo de la tubulina (Skinner et al., *J. Biol. Chem.* 266:15163-15166 (1991)); y el marcador del péptido de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6393-6397 (1990)).

Anticuerpos de los polipéptidos de la GPR64

[0097] Una vez que se ha producido la proteína GPR64, se utiliza para generar anticuerpos, por ejemplo, para la inmunoterapia y la inmunodiagnos. De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos reconocen el mismo epítopo de un polipéptido de la GPR64 como GPR64-18. La capacidad de un anticuerpo específico para reconocer el mismo epítopo como otro anticuerpo suele venir determinada por la capacidad de un anticuerpo para inhibir de forma competitiva el enlace del segundo epítopo con el antígeno. Puede utilizarse cualquier de los diversos ensayos de enlace competitivos para medir la competencia entre dos anticuerpos del mismo antígeno. Un ejemplo de ensayo es el ensayo Biacore descrito en los siguientes ejemplos. En dichos ensayos, los emplazamientos de los enlaces pueden mapearse en términos estructurales poniendo a prueba la capacidad de los interactuantes, por ejemplo, los diferentes anticuerpos, para inhibir el enlace de otro. La inyección de dos muestras consecutivas de anticuerpo con una concentración suficiente permite identificar parejas de anticuerpos competitivos para el mismo epítopo de enlace. Las muestras de anticuerpos deberían tener el suficiente potencial para alcanzar una saturación significativa con cada inyección. El enlace neto de la inyección del segundo anticuerpo resulta indicativo para el análisis del epítopo de enlace. Pueden utilizarse dos niveles de respuesta para describir los límites de un enlace perfectamente competitivo frente a uno no competitivo provocado por epítopos diferentes. La cantidad relativa de respuesta de enlace de la segunda inyección del anticuerpo, en relación con el enlace de epítopos de enlace idénticos y distintos, determina el grado del solapamiento de los epítopos.

[0098] Pueden utilizarse otros inmunoensayos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden diferenciarse por el epítopo al que se unen utilizando un ensayo USA tipo sandwich. Éste se lleva a cabo utilizando un anticuerpo de captura para recubrir la superficie de un pocillo. A continuación se añade una concentración inferior a la saturación de un antígeno con marcador a la superficie de captura. Esta proteína se enlazaría al anticuerpo a través de una interacción específica anticuerpo: epítopo. Tras el lavado de un segundo anticuerpo, que se ha unido mediante un enlace covalente a un grupo detectable (por ejemplo, HRP, definiéndose el anticuerpo etiquetado como el anticuerpo de detección) se añade al ELISA. Si este anticuerpo reconoce el mismo epítopo que el anticuerpo de captura, no será capaz de unirse a la proteína diana, ya que dicho epítopo específico no estará ya disponible para el enlace. No obstante, si este segundo anticuerpo reconoce un epítopo diferente en la proteína diana, será capaz de unirse, y este enlace podrá ser detectado mediante la cuantificación del nivel de actividad (y por tanto, el enlace con el anticuerpo) utilizando un sustrato adecuado. El fondo se define utilizando un único anticuerpo como anticuerpo de captura y de detección, mientras que la señal máxima se puede establecer mediante la captura con un anticuerpo específico del antígeno y la detección con un anticuerpo del marcador en el antígeno. Utilizando las señales de fondo y máxima como referencias, los anticuerpos pueden evaluarse por parejas, para determinar la especificidad del epítopo.

[0099] Se considera que un primer anticuerpo inhibe competitivamente el enlace de un segundo anticuerpo si el enlace del segundo anticuerpo con el antígeno se reduce al menos en un 30%, normalmente al menos en un 40%, 50%, 60% o 75%, y frecuentemente al menos en un 90%, en presencia del primer anticuerpo, utilizando cualquiera de los ensayos que se han descrito anteriormente.

[0100] Cualquier técnico versado en la materia conoce los métodos de preparación de anticuerpo policlonales (por ejemplo, Coligan, supra; y Harlow & Lane, supra). Los anticuerpos policlonales pueden criarse en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizador y, si se desea, de un adyuvante. Normalmente, el agente inmunizador y/o el adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir una proteína codificada por un ácido nucleico de las figuras o un fragmento del mismo, o una proteína procedente de la fusión del mismo. Puede resultar útil conjugar el agente inmunizante con una proteína conocida como inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Entre los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas se incluyen, sin limitación, la hemocianina de la lapa de ojo de cerradura, la albúmina del suero, la tiroglobulina bovina, y el inhibidor de la tripsina de la soja. Entre los ejemplos de los adyuvantes que pueden utilizarse se encuentra el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por un técnico en la materia sin necesidad de experimentar.

[0101] Alternativamente, los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando métodos de hibridoma, como los descritos por Kohler & Milstein, Nature 256:495 (1975). En un método de hibridoma, suele inmunizarse un ratón, un hámster u otro animal receptor adecuado con un agente inmunizante para hacer que los linfocitos que producen o que son capaces de producir anticuerpos se unan específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados in vitro. Por lo general, el agente inmunizante incluirá un polipéptido codificado por un ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o un fragmento del mismo, o una fusión de la secuencia de proteínas de SEQ ID NO:2 o fragmentos de la misma.

[0102] Por lo general, se utilizan indistintamente linfocitos sanguíneos periféricos ("PBLs") si se desean células de origen humano, o células del bazo o de los ganglios linfáticos, en caso de que se deseen fuentes procedentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan entonces con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, como el glicol de polietileno, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (1986)). Por lo general, las líneas celulares inmortalizadas son células de mamíferos transformadas, concretamente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Por lo

general, se utilizan líneas celulares de mielomas de rata o ratón. Las células del hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado, que contenga preferiblemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima Hipoxantina - Guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo de los hibridomas incluirá normalmente la hipoxantina, la aminopterina y la timidina (medio "HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de las células HGPRT - deficientes.

[0103] La figura 2 muestra las secuencias de aminoácido y de nucleótido de las regiones V_H y V_L de cinco anticuerpos monoclonales de la GPR64: GPR64-1, -16, -18, -20 y -48. (SEQ ID NOs: 3-22). Además, en la tabla de la figura 5 se recogen otros 41 mAbs adicionales generados a partir de una fusión GPR64-Fc efectuada de acuerdo con los métodos estándar, junto con sus propiedades de enlace. Dos de estos mAbs de la GPR64, el N° 81 y el N° 93 (también denominados OAM6#81 y OAM6#93), se depositaron en la ATCC el 18 de diciembre de 2003.

[0104] En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos quiméricos o humanizados. Como se ha indicado anteriormente, las formas humanizadas de los anticuerpos son inmunoglobulinas quiméricas en las que los residuos procedentes de una región determinante complementaria (CDR) del anticuerpo humano se sustituyen por residuos procedentes de una CDR de una especie no humana, como un ratón, una rata o un conejo que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

[0105] Los anticuerpos humanos puede producirse utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las genotecas "phage display" (Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 (1991)). Las técnicas de Cole et al. y de Roemer et al., también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, p. 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol. 147(1):86-95 (1991)). Igualmente, pueden obtenerse anticuerpos humanos introduciendo *loci* de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones, cuyos genes endógenos de inmunoglobulina hayan sido total o parcialmente desactivados. Al mediar la provocación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho en todos los aspectos a la observada en los seres humanos, incluyendo la redistribución de los genes, su ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este método se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, así como en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Lonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995).

[0106] En algunas realizaciones, el anticuerpo es una cadena única Fv (scFv). Las regiones V_H y V_L de un anticuerpo scFv comprenden una cadena única que se pliega para crear un emplazamiento de enlace de antígeno similar al encontrado en los anticuerpos de dos cadenas. Una vez plegado, las interacciones no covalentes estabilizan el anticuerpo de cadena única. Aunque las regiones V_H y V_L de algunas realizaciones de anticuerpos pueden unirse directamente, un experto en la materia se dará cuenta de que las regiones pueden separarse mediante un enlazador (linker) péptido consistente en uno o más aminoácidos. Los enlazadores péptidos y su utilización son perfectamente conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Huston et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 8:5879 (1988); Bird et al., Science 242:4236 (1988); Glockshuber et al., Biochemistry 29:1362 (1990); la patente estadounidense N° 4.946.778, la patente estadounidense N° 5.132.405 y Stemmer et al., Biotechniques 14:256-265 (1993). En general, el enlazador péptido carecerá de actividad biológica específica, a excepción de la de unirse a las regiones o mantener una distancia mínima, o mantener otra relación espacial entre V_H y V_L . No obstante, los aminoácidos constituyentes del enlazador péptido pueden seleccionarse de forma que influyan en determinadas propiedades de la molécula, como el plegado, la carga neta o la hidrofobia. Los anticuerpos de cadena única Fv (scFv) incluyen opcionalmente un enlazador péptido con una longitud de no más de 50 aminoácidos, generalmente con no más de 40 aminoácidos, preferiblemente con no más de 30 aminoácidos, y más preferiblemente con no más de 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador péptido es un concatémero de la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, preferiblemente 2, 3, 4, 5, o 6 de dichas secuencias. No obstante, ha de apreciarse que pueden realizarse algunas sustituciones del aminoácido dentro del enlazador. Por ejemplo, puede sustituirse una valina por una glicina.

[0107] Se han descrito los métodos de realización de anticuerpos scFv. Véase, Huse et al., *supra*; Ward et al. *supra*; y Vaughan et al., *supra*. En resumen, el mRNA procedente de las células B de un animal inmunizado se aísla y se prepara el cDNA. El cDNA se amplifica utilizando los imprimadores específicos para las regiones variables de cadena ligera y pesada de las inmunoglobulinas. Los productos PCR se purifican y se unen las secuencias de ácido nucleico. Si se desea un enlazador péptido, las secuencias de ácido nucleico que codifican el péptido se insertan entre las secuencias de ácido nucleico de cadena ligera y pesada. El ácido nucleico que codifica la scFv se inserta en un vector y se expresa en la célula receptora adecuada. Los scFv que se unen específicamente al antígeno deseado suelen encontrarse cribando una "genoteca phage display". El cribado puede realizarse siguiendo uno de varios métodos. El cribado puede realizarse de forma conveniente utilizando células que expresen el antígeno deseado en su superficie o utilizando una superficie sólida revestida con el antígeno deseado. Convenientemente, la superficie puede ser un lecho magnético. Los fagos no enlazados se eliminan por lavado de la superficie sólida, y los fagos unidos se someten a elusión.

[0108] El hallazgo del anticuerpo con la mayor afinidad está relacionado con la eficiencia del proceso de selección, y depende del número de clones que pueden filtrarse y las restricciones aplicadas. Normalmente, un mayor carácter

restrictivo se corresponde con un cribado más selectivo. No obstante, si las condiciones son demasiado restrictivas, el fago no se unirá. Tras una ronda de cribado, el fago que se une a las placas revestidas con GPR64 o a las células que expresan el GPR64 en su superficie se expande en *E. coli* y se somete a otra ronda de cribado. De este modo se realiza un enriquecimiento múltiple en 3 rondas de cribado. De este modo, aunque el enriquecimiento sea bajo en cada ronda, un elevado número de rondas de cribado llevarán al aislamiento de fagos raros y el material genético que contienen y con el que se une el scFv con la mayor afinidad, o uno que se exprese mejor en el fago.

[0109] Independientemente del método de cribado seleccionado, el enlace físico entre el genotipo y el fenotipo proporcionado por la técnica “phage display” permite comprobar enlaces con antígenos en todos los miembros de una librería cDNA, aún en el caso de extensas librerías de clones. La aplicación muestra asimismo anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que presentan especificidades de enlace para al menos dos antígenos diferentes o que presenten especificidades de enlace para dos epítopes del mismo antígeno. En una realización, una de las especificidades de enlace corresponde a la proteína GPR64, y la otra corresponde a otro antígeno del cáncer. Alternativamente, pueden crearse reactivos multivalentes mediante la tecnología de tipo tetrámero.

[0110] En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la proteína GPR64 son capaces de reducir o eliminar las células que expresan la GPR64 (*por ejemplo, las células del cáncer de ovario*). Por lo general, se prefiere al menos una disminución del 25% en la actividad, el crecimiento, el tamaño o parámetros similares, prefiriéndose especialmente al menos un 50% y prefiriéndose especialmente una reducción del 95-100%.

[0111] Por inmunoterapia nos referimos al tratamiento del cáncer de ovario mediante un anticuerpo que actúa contra las proteínas GPR64. Tal y como se utiliza en este documento, la inmunoterapia puede ser pasiva o activa. Inmunoterapia pasiva, según se define en este documento, consiste en la transferencia pasiva de un anticuerpo a un receptor (paciente). La inmunización activa es la inducción de las respuestas del anticuerpo y/o las células T en un receptor (paciente). La inducción de una respuesta inmune es el resultado de facilitar al receptor un antígeno (*por ejemplo, GPR64 o el ADN que lo codifica*) frente al que reaccionan los anticuerpos. Como observará cualquier persona versada en la materia, el antígeno puede facilitarse inyectando un polipéptido contra el que se desea que reaccionen los anticuerpos en un receptor, o poniendo en contacto el receptor con un ácido nucleico capaz de expresar el antígeno y en unas condiciones de expresión del antígeno, que provoque una respuesta positiva.

[0112] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención se conjuga con un grupo efector. El grupo efector puede ser cualquier número de moléculas, incluyendo los grupos de etiquetado, como las etiquetas radioactivas o etiquetas fluorescentes, o puede ser un grupo terapéutico. En un aspecto, el grupo terapéutico es una pequeña molécula que modula la actividad de la proteína GPR64. En otro aspecto, el grupo terapéutico modula la actividad de las moléculas asociadas o muy cercanas a la proteína GPR64.

[0113] En otras realizaciones, el grupo terapéutico es un agente citotóxico. En este método, el dirigir el agente citotóxico contra los tejidos o células del cáncer de ovario tiene como resultado una reducción del número de células afectadas, reduciendo de este modo los síntomas asociados con el cáncer de ovario. Los agentes citotóxicos son numerosos, e incluyen, sin limitación, fármacos o toxinas citotóxicas o fragmentos activos de dichas toxinas. Entre las toxinas adecuadas y sus correspondientes fragmentos se encuentra la cadena de la difteria A, la cadena de la exotoxina A, la cadena del ricino A, la cadena de la abrina A, la curcina, crotina, fenomicina, enomicina, auristatina y similares. Los agentes citotóxicos también incluyen agentes radioquímicos, obtenidos, conjugando radioisótopos con los anticuerpos que reaccionan contra las proteínas del cáncer de ovario, o enlazando un radionucleido con un agente quelante que se ha unido al anticuerpo mediante un enlace covalente. La reacción del grupo terapéutico con las proteínas de la membrana del cáncer de ovario no sólo sirve para incrementar las concentraciones locales del grupo terapéutico en la zona afectada por el cáncer de ovario, pero también sirve para reducir los efectos secundarios negativos que pueden estar asociados al grupo terapéutico.

Afinidad de enlace de los anticuerpos de la invención

[0114] Los anticuerpos de la invención se unen específicamente al mismo epítopo de un polipéptido de la a GPR64, como el GPR64-18. En las realizaciones preferidas, los anticuerpos se unen a la GPR64 con una elevada afinidad y presentan unos valores K_D inferiores a 1 μM , preferiblemente inferiores a 0,01 μM , y más preferiblemente, de 0,01 μM , o incluso subnanomolares.

[0115] En una realización, la afinidad de un anticuerpo de la GPR64 puede determinarse mediante un ensayo de inhibición competitiva frente a otro anticuerpo de la GPR64 (*por ejemplo, uno con una afinidad conocida*) frente a la unión con un polipéptido de la GPR64. Una fuerte inhibición competitiva indica una fuerte afinidad de enlace con la GPR64.

[0116] La afinidad de enlace de un antígeno diana suele medirse o determinarse mediante pruebas estándar de anticuerpo-antígeno como el análisis competitivo de Biacore, ensayos de saturación o inmunoensayos como ELISA o RIA.

[0117] Dichos ensayos pueden utilizarse para determinar la constante de disociación del anticuerpo. El término “constante de disociación” se refiere a la afinidad de un anticuerpo por un antígeno. Existe especificidad del enlace

entre un anticuerpo y un antígeno si la constante de disociación ($k_D = 1/K$, donde K es la constante de afinidad) del anticuerpo es $< 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $< 100 \text{ nM}$, y más preferiblemente $< 0,1 \text{ nM}$. Típicamente, las moléculas del anticuerpo tendrán un valor de k_D situado en los rangos más bajos. $k_D = [\text{Ab-Ag}]/[\text{Ab}][\text{Ag}]$, donde $[\text{Ab}]$ es la concentración en el punto de equilibrio del anticuerpo, $[\text{Ag}]$ es la concentración en el punto de equilibrio del antígeno y $[\text{Ab-Ag}]$ es la concentración en el punto de equilibrio del complejo anticuerpo-antígeno. Normalmente, las interacciones del enlace entre el antígeno y el anticuerpo incluyen asociaciones no covalentes reversibles, como la atracción electrostática, las fuerzas de Van der Waals y los enlaces de hidrógeno.

Inmunoensayos

[0118] Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para la detección de GPR64 o de células que expresan la proteína GPR64, utilizando cualquiera de los ensayos de enlace inmunológico conocidos véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168). Para revisar los inmunoensayos generales, véase también *Methods in Cell Biology*, Vol. 37, Asai, ed. Academic Press, Inc. New York (1993); *Basic and Clinical Immunology* 7th Edition, Stites & Terr, eds. (1991).

[0119] De este modo, la presente solicitud muestra métodos para la detección de células que expresan la GPR64. En un método, se realiza una biopsia del paciente y los tejidos se someten a una prueba in Vitro. El tejido o las células procedentes del tejido se ponen en contacto con un anticuerpo anti-GPR64 de la invención. Cualquier complejo inmune obtenido como resultado indica la presencia de la proteína GPR64 en la muestra de la biopsia. Para facilitar dicha detección, el anticuerpo puede radioetiquetarse o acoplarse a un grupo efector que constituya una etiqueta detectable, como una radioetiqueta.

[0120] En otro método, las células pueden detectarse in vivo utilizando los sistemas gráficos conocidos. Posteriormente, la localización de la etiqueta se determina mediante cualquiera de los métodos conocidos para la detección de la etiqueta. Puede utilizarse un método convencional de visualización de imágenes para diagnóstico. Por ejemplo, pueden utilizarse isótopos paramagnéticos para MRI. La internalización del anticuerpo puede ser importante a la hora de ampliar la vida útil en el organismo más allá de la proporcionada por un enlace extracelular, sujeto a la habilitación por el entorno enzimático extracelular y la habilitación circulatoria.

[0121] Las proteínas GPR64 también pueden detectarse utilizando métodos estándar de inmunoensayo y los anticuerpos de la invención. Los métodos estándar, por ejemplo, el radioinmunoensayo, los inmunoensayos tipo sandwich (incluyendo ELISA), los ensayos de inmunofluorescencia, Western blot, cromatografía de afinidad (ligando de afinidad unido a una fase sólida), y detección in situ mediante anticuerpos etiquetados.

Supresión de la expresión endógena del gen de la GPR64 mediante la utilización de RNAi

[0122] En muchas especies, la introducción del ARN de cadena doble RNA (dsRNA) al que alternativamente se puede hacer referencia en este documento como ARN pequeño de interferencia RNA (siRNA), induce un potente y específico silenciamiento del gen, un fenómeno llamado interferencia ARN o RNAi. Este fenómeno se ha documentado ampliamente en el nematodo *C. elegans* (Fire, A., et al, *Nature*, 391, 806-811, 1998), pero es muy amplio en otros organismos, desde los tripanosomas hasta el ratón. El función del organismo en cuestión, se ha denominado la interferencia del ARN “cosupresión”, “silenciamiento del gen post-transcripcional”, “supresión del sentido” y “extinción”.

[0123] El RNAi resulta atractivo como herramienta biotecnológica, ya que facilita un medio para eliminar la actividad de genes específicos. Resulta especialmente útil para eliminar la expresión del gen en especies de las que previamente no se consideraba que fuesen susceptibles de análisis genéticos o manipulación.

[0124] A la hora de diseñar los experimentos RNAi existen diversos factores que han de tenerse en cuenta, como la naturaleza del dsRNA, la duración del efecto de silenciamiento y la elección del sistema de entrega.

[0125] Para producir un efecto RNAi, el dsRNA o ssRNA introducido en el organismo debería contener secuencias exónicas. Además, el proceso RNAi es dependiente de la homología, de forma que las secuencias deben seleccionarse cuidadosamente para maximizar la especificidad del gen, reduciendo la posibilidad de interferencias mutuas entre secuencias homólogas, pero no específicas del gen. Preferiblemente, el dsRNA presenta una identidad superior al 90% o incluso del 100% entre la secuencia del dsRNA y del gen que va a inhibirse. Las secuencias que sean idénticas en menos de un 80% al gen diana son sustancialmente menos eficaces. De este modo, cuanto mayor sea la homología entre el dsRNA y el gen cuya expresión se quiere inhibir, menor será la expresión viva de genes no relacionados que se consiga.

[0126] Además, el tamaño del dsRNA es importante. Con frecuencia se utiliza el dsRNA con una longitud superior a 500 pares base, aunque unos fragmentos más pequeños pueden también producir un efecto RNAi.

[0127] La introducción del dsRNA puede conseguirse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, microinyección o electroporación. Se han propuesto diversos mecanismos mediante los cuales el dsRNA puede inhibir la expresión del gen, pero se carece de evidencias que respalden cualquier mecanismo específico (Fire, A., 1999).

Administración de las composiciones farmacológicas y vacunas

[0128] Los anticuerpos de la invención pueden formularse en composiciones farmacológicas. De este modo, la presente solicitud también muestra métodos y composiciones para la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-GPR64. La dosis exacta dependerá de la finalidad del tratamiento, y podrá ser evaluada por una persona versada en la materia utilizando técnicas bien conocidas (por ejemplo, Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery; Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992), Dekker, ISBN 0824770846, 082476918X, 0824712692, 0824716981; Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); y Pickar, Dosage Calculations (1999)). Como se conoce en la industria, pueden ser necesarios ajustes para la degradación del cáncer de ovario, administración sistémica frente a localizada, y tasa de nueva síntesis de la proteasa, así como la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción del fármaco y gravedad de la enfermedad, pudiendo ser evaluados por un experto en la materia mediante experimentación rutinaria.

[0129] Un "paciente" a los efectos de la presente invención incluye seres humanos y otros animales, especialmente mamíferos. De este modo, los métodos son de aplicación a la terapia humana y las aplicaciones veterinarias. En la realización preferida, el paciente es un mamífero, preferentemente un primate, y en la realización a la que se hacen más referencias, el paciente es un ser humano.

[0130] La administración de los anticuerpos de la presente invención puede llevarse a cabo de diversas formas, como se ha comentado anteriormente, incluyendo sin limitación, por vía oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal o intraocular.

[0131] Las composiciones farmacológicas de la presente invención comprenden un anticuerpo de la invención en una forma adecuada para su administración a un paciente. Por ejemplo, las composiciones farmacológicas pueden encontrarse en una forma soluble en agua, como sales farmacológicamente aceptables, incluyendo sales de adición ácida o básica. "Sal de adición ácida farmacológicamente aceptable" se refiere a aquellas sales que mantienen la efectividad biológica de las bases libres y que no son biológicamente no deseables, formadas con ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos como el ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido piruvico, ácido oxálico, ácido maléico, ácido alónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácidometanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. "Sales de adición básica farmacológicamente aceptables incluyen las derivadas de bases inorgánicas como el sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, sales de aluminio y similares. Los productos preferidos son las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las sales obtenidas a partir de bases orgánicas no tóxicas farmacológicamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y ateanolamina.

[0132] Las composiciones farmacológicas también pueden incluir uno o más de los siguientes productos: proteínas portadoras, como albúmina de suero; soluciones tampón; rellenos como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes ligantes; edulcorantes y otros agentes aromatizantes; colorantes; y glicol de polietileno.

[0133] Las composiciones farmacológicas pueden administrarse en diversas formas de dosificación unitaria, en función del método de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitaria adecuadas para su administración oral incluyen, sin limitación, polvo, pastillas, píldoras, cápsulas y comprimidos. Se reconoce que los anticuerpos, cuando se administran por vía oral, deberían protegerse frente a la digestión, lo que suele conseguirse reuniendo en un complejo las moléculas y una composición que las haga resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática, o integrando las moléculas en un portador adecuadamente resistente, como un liposoma o una barrera protectora. En la industria se conocen diversos medios para proteger a los agentes frente a la digestión.

[0134] Las composiciones para su administración incluirán normalmente un anticuerpo de la invención disuelto en un portador o excipiente farmacológicamente aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Pueden utilizarse diversos portadores acuosos, por ejemplo, soluciones salinas tampón y similares. Estas soluciones son estériles y en general están libres de sustancias no deseables. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, y bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacológicamente aceptables, que sean necesarias para aproximarse a las condiciones fisiológicas, como el ajuste del pH y los agentes reguladores, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, cloruro cálcico, lactato sódico y similares. La concentración de agente activo en estas formulaciones puede experimentar diversos cambios y se seleccionará fundamentalmente en función de los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares, de acuerdo con el modo de administración específico seleccionado y las necesidades del paciente (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., 1980) y Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et al., eds., 1996)).

[0135] De este modo, una típica composición farmacológica para su administración intravenosa sería de entre 0.1 y 10 mg por paciente y día. Pueden usarse dosis de entre 0.1 hasta 100 mg por paciente y día, sobre todo cuando el fármaco se administra en un punto aislado y no en el torrente sanguíneo, como en una cavidad del cuerpo o en el

lumen de un órgano. Son posibles unas dosis sustancialmente más elevadas cuando la administración es por vía tópica. Las personas versadas en la técnica conocerán o imaginarán métodos de preparación de composiciones que puedan administrarse por vía parenteral, por ejemplo, a través de *Remington's Pharmaceutical Science* y de Goodman and Gillman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, supra.

[0136] Las composiciones que contienen los anticuerpos de la invención pueden administrarse para tratamientos terapéuticos o profilácticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que padezca una enfermedad (por ejemplo, un cáncer) en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr este fin es lo que se define como una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para esta utilización dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado de salud general del paciente. La administración puede ser única o múltiple, en función de la dosis y la frecuencia, de acuerdo con lo requerido y tolerado por el paciente. En cualquier caso, la composición debería aportar una cantidad suficiente de los agentes de la invención para tratar eficazmente al paciente. Una cantidad de modulador que sea capaz de impedir o de ralentizar el desarrollo del cáncer en un mamífero se define como una "dosis profilácticamente efectiva". La dosis específica requerida para un tratamiento profiláctico dependerá de la condición médica y del historial del mamífero, del cáncer específico que se quiere impedir, y de otros factores, como la edad, el peso, el sexo, la vía de administración, eficacia, etc. Estos tratamientos profilácticos podrán utilizarse, por ejemplo, en un mamífero que haya tenido previamente cáncer, para impedir una recurrencia del cáncer, o en un mamífero del que se sospeche que tiene una elevada probabilidad de desarrollar cáncer.

[0137] Se observará que los presentes compuestos para la modulación de la proteína del cáncer de ovario pueden administrarse de forma aislada o en combinación con otros compuestos adicionales para la modulación del cáncer de ovario u otros agentes terapéuticos, por ejemplo, otros agentes o tratamientos contra cáncer.

Kits para su uso en aplicaciones de diagnóstico y/o prognosis

[0138] La presente aplicación también hace referencia a kits para su utilización en la investigación diagnóstica y las aplicaciones terapéuticas sugeridas anteriormente. En las aplicaciones de diagnóstico e investigación, dichos kits pueden incluir cualquiera o todos los elementos siguientes: reactivos de ensayo, reguladores y los anticuerpos específicos de la GPR64 de la invención. Un producto terapéutico puede incluir una solución salina estéril u otra emulsión farmacológicamente aceptable y una base de suspensión.

[0139] Adicionalmente, los kits pueden incluir materiales de formación que contengan instrucciones (es decir, protocolos) para poner en práctica los métodos de esta invención. Aunque los materiales de formación suelen comprender materiales escritos o impresos, no se limitan tan sólo a los mismos. La presente invención contempla cualquier medio que sea capaz de almacenar dichas instrucciones de comunicarlas a un usuario final. Dichos medios incluyen, sin limitación, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones de páginas de Internet en las que se faciliten dichos materiales de formación.

EJEMPLOS:

Ejemplo 1: Perfil de expresión del gen GPR64 en tejidos con cáncer de ovario y normales

[0140] Este ejemplo describe el análisis de la expresión génica GeneChip para la identificación de la GPR64 como una diana válida para el cáncer de ovario.

Resumen

[0141] Se comparó la expresión génica de 66 muestras de cáncer de ovario con 347 tejidos adultos normales que representaban 58 órganos diferentes. El objetivo consistió en buscar genes que estén sobrerregulados en el cáncer de ovario y que se encuentren localizados en la superficie celular con accesibilidad del anticuerpo, pero que presenten poca o ninguna expresión en órganos vitales, a fin de reducir al mínimo los efectos secundarios no deseables de un anticuerpo terapéutico. Se examinaron los genes con el perfil de expresión deseado mediante un amplio análisis bioinformático a fin de determinar su clasificación estructural y funcional y determinar su potencial de localización de la superficie celular. El gen GPR64 (Secuencia de referencia N° NM_005756.1 del National Center for Biotechnology Information; Ref. Osterhoff et al., 1997, DNA Cell Biol. 16:379-389) mostró todas las características deseadas.

Protocolos de extracción del ARN y de micromatrices.

[0142] La preparación del ARN total a partir de tejidos frescos congelados de próstata y xenoinjertos se llevó a cabo mediante extracción con el reactivo Trizol (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) y se efectuó la transcripción inversa utilizando un imprimador que contenía ácido oligo-desoxitimidílico y una secuencia promotora 17. Los cDNAs resultantes se transcribieron in vitro en presencia de nucleótidos biotinilados (Bio-11-CTP y Bio-16-UTP) utilizando el kit T7 MEGAscript (Ambion, Austin, TX).

[0143] Las dianas biotiniladas se hibridaron con la Eos Hu03, una matriz de oligonucleótidos personalizada de Affymetrix GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA) que comprende 59,619 conjuntos de sondas que representan 46,000 secuencias únicas, incluyendo los exones conocidos y predichos por FGENESH basados en la primera lista preliminar del genoma humano. Los conjuntos de sondas Hu03 consisten exclusivamente en sondas de coincidencia perfecta, y la mayor parte de los conjuntos de sondas tienen 6 o 7 sondas. Los signos de hibridación se visualizaron utilizando estreptavidina conjugada con fiococitina (Molecular Probes, Eugene, OR).

[0144] La normalización de los datos de expresión génica se llevó a cabo de la forma siguiente. Los datos de intensidad del nivel de la sonda procedentes de cada matriz se adaptaron a una distribución fija, utilizando una función inversa para el trazado gráfico de la distribución acumulativa empírica de intensidades para disponer de la distribución deseada. Este procedimiento es similar a otros procedimientos de normalización por chip, como la fijación de la media y la desviación estándar de cada chip con respecto a un valor estándar, salvo que es más restrictivo en el sentido de que fija la distribución completa en lugar de uno o dos parámetros. La finalidad de la normalización por chip consiste en eliminar la variación entre chips, suponiendo que puede atribuirse a factores no biológicos, es decir, a ruido técnico. El parámetro de escala correspondiente a la distribución se seleccionó de forma que arrojase una distribución con un valor medio arbitrario de 300, y se seleccionó el parámetro de forma de 0.81 para reproducir la forma típica de la distribución empírica apreciada en las muestras correctas.

[0145] Se calculó una medida única de intensidad media para cada conjunto de sondas, utilizando el "trimean de Tukey" de la intensidad de las sondas constituyentes (Tukey J. W. Análisis de Datos de Exploración, Addison-Wesley Reading, Massachusetts 1977). El método "trimean" es una medida de la tendencia central resistente a los efectos de los valores atípicos. Por último, se aplicó una sustracción de fondo a cada medida de la intensidad media para corregir la hibridación no específica. La medida de la intensidad media de un conjunto de sondas "nulo" consistente en 491 sondas con una secuencia codificada se sustrajo de la totalidad del resto de los conjuntos de sondas del chip.

Resultados

[0146] Se observó una elevada sobreexpresión del gen GPR64 en el caso del cáncer de ovario en comparación con los tejidos corporales normales. Se detectó alguna expresión en los ganglios de las raíces dorsales y las glándulas paratiroides. No se detectó expresión alguna en ovarios normales, así como en el resto de los tejidos normales sometidos a prueba. Entre los tejidos que no padecen cáncer de ovario, se detectaron también unos elevados niveles de expresión en el caso del sarcoma de Ewing. Se detectaron unos niveles inferiores de expresión de GPR64 en cánceres uterinos, pero no se apreció ninguna expresión en otros cánceres, incluyendo cáncer de colon, de mama, de próstata de pulmón, de páncreas y de riñón.

Ejemplo 2: La Anti-GPR64 inhibe el crecimiento de las células tumorales *In Vivo*.

[0147] El siguiente ejemplo muestra que los anticuerpos GPR64 son efectivos para la reducción del volumen del tumor *in vivo*.

[0148] Los estudios en animales se realizaron utilizando ratones SCID inmunizados con la línea celular tumoral humana NCI-H460. La línea celular NCI-H460 expresa el antígeno reconocido por el anticuerpo GPR64-18. Las secuencias de nucleótido y aminoácido V_H y V_L del anticuerpo GPR64-18 se facilitan en la Fig. 2 (SEQ ID Nos: 7, 8, 17, 18).

[0149] Los anticuerpos se obtuvieron mediante métodos estándar, utilizando una proteína de fusión entre el N-terminal del GPR64 y el Fc humano utilizado como inmunogen.

[0150] Para iniciar el crecimiento tumoral, se inyectó *in vivo* a ratones SCID la línea celular tumoral NCI-H460 y se permitió que se desarrollasen los tumores. Cuando los tumores alcanzaron unas dimensiones de entre 50 y 100 mm³, los animales se distribuyeron en grupos y se sometieron a tratamiento con:

a) un isotipo del anticuerpo de control;

b) uno de los cinco anticuerpos GPR64, cuyas secuencias V_H y V_L se describen en la figura 2 (SEQ ID NOs:2-22), o

c) uno de los cinco anticuerpos GPR64 en conjunción con los agentes quimioterapéuticos paclitaxel y carboplatina.

[0151] Los anticuerpos se administraron cada 2 días, a una dosis de 10 mg/kg. Para el grupo sometido al anticuerpo más quimioterapia, las quimioterapias se administraron conjuntamente a intervalos de 4 días en 4 dosis, y los anticuerpos se administraron a razón de 10 mg/kg a intervalos de 4 días en 3 dosis. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana durante 20 días.

[0152] Los resultados de estos experimentos demostraron que, en comparación con los ratones que recibieron tratamiento con el isotipo del anticuerpo de control, los ratones que recibieron tratamiento con el anticuerpo GPR64-18 experimentaron una significativa reducción del volumen del tumor.

[0153] Los experimentos en los que se comparó la reducción del tumor conseguida mediante los anticuerpos, en combinación con la quimioterapia, mostraron que el volumen del tumor se redujo en una proporción mayor cuando se utilizó el anticuerpo GPR64 en combinación con en la quimioterapia que cuando el isotipo de control del anticuerpo se combinó con el agente terapéutico. Asimismo, los anticuerpos GPR64-18 presentaron un efecto aditivo en combinación con el agente terapéutico.

[0154] De este modo, los anticuerpos GPR64-18 resultan eficaces para reducir el volumen tumoral y pueden utilizarse para aportar un tratamiento eficaz para los cánceres en los que se expresa la proteína GPR64. Además, cualquier anticuerpo que se una de este modo a la proteína GPR64 para inhibir el enlace del anticuerpo GPR64-18 puede utilizarse para facilitar un tratamiento efectivo para los cánceres en los que se expresa la proteína GPR64.

[0155] Además, teniendo en cuenta que los efectos de los anticuerpos GPR64 y los agentes quimioterapéuticos sobre la reducción del volumen del tumor son aditivos, el uso de los anticuerpos GPR64 reducirá la cantidad de agente quimioterapéutico necesario para la reducción del tamaño del tumor en pacientes con cáncer, reduciendo de este modo el sufrimiento del paciente causado por los efectos secundarios tóxicos de los agentes quimioterapéuticos.

Ejemplo 3: La reducción de la GPR64 por el RNAi inhibe la proliferación de células cancerosas con expresión de la GPR64

[0156] El siguiente ejemplo muestra que la expresión de la GPR64 es esencial para el crecimiento de las células tumorales *in vitro* y valida la GPR64 como una diana del cáncer de ovario.

[0157] Las proteínas pueden regularse a la baja utilizando ARNs de doble cadena de interferencia (siRNA) específicos del mRNA relacionado de la proteína de interés. Este método se ha utilizado para demostrar que la inhibición de la GPR64 regula a la baja el crecimiento celular y provoca la muerte celular. De este modo, estos experimentos están en línea con los resultados de los experimentos descritos en el Ejemplo 2 y de este modo confirman la conclusión básica de que la regulación a la baja de la expresión de la GPR64 facilitará un tratamiento efectivo para los cánceres con expresión de la proteína GPR64.

Método de ensayo del RNAi

[0158] Los plásmidos que codifican un siRNA específico de la GPR64, o un siRNA de control, se introdujeron en dos líneas celulares tumorales humanas de la two GPR64+ que requieren la GPR64 para su crecimiento: H460, Mel 80. Además, se introdujeron los mismos siRNAs en las células PC3 de la GPR64- que no precisan la GPR64 para su crecimiento. El nivel de proteína GPR64 se siguió mediante la utilización de FRCS, y se evaluaron los efectos sobre el crecimiento utilizando un ensayo que mide la supervivencia y proliferación celular.

[0159] Las células tumorales humanas se transfectaron con siRNAs OAM6 utilizando Lipofectamine2000 (Invitrogen) como sigue: Se disolvió la Lipofectamine2000 en un Medio esencial Mínimo 1:50 sin rojo de fenol (Invitrogen) y se mezcló en volúmenes iguales con el siRNA apropiado a 120nM en MEM. La mezcla de Lipofectamine2000/siRNA se situó en una placa de 96 pocillos, y las células se trasladaron con pipeta para obtener una concentración final de siRNA de 10nM. Las células transfectadas se incubaron a 37° C; la cantidad de proliferación celular se determinó a las 24, 48, 72, y 96 horas con posterioridad a la transfección utilizando un ensayo MTS con un ensayo de proliferación celular no radioactiva acuosa CellTiter 96® (Promega Corporation), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó la lectura de la absorbencia a 490nm. Cada punto de datos representa la media de los pocillos triplicados.

[0160] Los siRNAs se adquirieron a Dharmacon como dúplex con salientes en 3'dTdT. Las secuencias siRNA utilizadas fueron las siguientes:

H2R-1 (control negativo) secuencia: 5'-CAGACACGGCCACGUGUGAdTdT-3' (SEQ ID NO: 23)

H2R-1 anti-secuencia: 5'-UCACACGUGGCCGUGUCUGdTdT-3' (SEQ ID NO: 24)

HKSP-1 (control positivo) secuencia: 5'-GCUAGCGCCCAUUCAAUAGdTdT-3' (SEQ ID NO: 25)

HKSP-1 anti secuencia: 5'-CUAUUGAAUGGGCGCUAGCdTdT-3' (SEQ ID NO: 26)

OAM6-110 secuencia: 5'-GCUUACUCCCUUCAAACGAdTdT-3' (SEQ ID NO: 27)

OAM6-110 antisequencia: 5'-UCG000GAAGGGAGUAAGCdTdT-3' (SEQ ID NO: 28)

OAM6-111 secuencia: 5'-CCCCAGAGAAUAUCUGCAdTdT-3' (SEQ ID NO: 29)

OAM6-111 antisequencia: 5'-UGCAGAUAA00CUCUGGGdTdT-3' (SEQ ID NO: 30)

Resultados

[0161] El siRNA OAM6-110 provocó una modulación a la baja de la expresión de la proteína GPR64 significativamente mayor que la OAM6-111, medida mediante un ensayo FRCS. Asimismo, las células que presentan una regulación a la baja de la expresión de la proteína GPR64, experimentaron un dramático descenso de la proliferación celular. Como se muestra en la figura 3, aunque los siRNAs OAM6-110 y OAM6-111 provocaron

un efecto detectable sobre la proliferación celular, la menor proliferación celular observada con el OAM6-110 fue muy superior a la observada con OAM6-111 en ambas líneas celulares positivas de la GPR64 (H460 y Me180). Esta diferencia relativa en la reducción del crecimiento celular entre OAM6-110 y OAM6-111 está correlacionada con la diferencia relativa en la modulación a la baja de la proteína GPR64 observada para estos dos siRNAs mediante el ensayo FRCS.

[0162] Resulta interesante el hecho de que el efecto del OAM6-110 fue incluso más fuerte que el de un siRNA de control positivo, la kinesina (HKSP1) en células H460 y Me180. Asimismo, la HKSP-1 elimina esencialmente la proliferación celular en PC3, que no expresa GPR64, y que no se ve afectada por ningún siRNA OAM6-110 o 111 con indicación de la especificidad.

[0163] El análisis siRNA se amplió a una muestra mayor de líneas celulares positivas y negativas GPR64. Como se muestra en la figura 4, tres de las cinco líneas celulares GPR+ mostraron efectos de proliferación al hacerlas reaccionar con el siRNA GPR64. Por el contrario, se observó que sólo dos de las 22 líneas celulares GPR64- mostraron efectos marginales de proliferación al ser tratadas con siRNA GPR64. Estos resultados están muy relacionados con la expresión de la GPR64 con susceptibilidad a la siRNA GPR64.

[0164] Estos resultados del siRNA respaldan la conclusión de que la GPR64 es necesaria para la proliferación de la GPR64 endógena con expresión de líneas celulares y tumores de ovarios, lo que valida la GPR64 como una diana funcional para el cáncer de ovario.

Ejemplo 4: Muestra de anticuerpos Monoclonales de la GPR64

[0165] Se generó una muestra de anticuerpos monoclonales y se comprobó su elevada afinidad de enlace con la GPR64 utilizando técnicas estándar.

[0166] Se inmunizaron ratones con una proteína de fusión GPR64-Fc. El constructo de fusión enlazó los aminoácidos 1-588 de la secuencia completa GPR64 (SEQ ID NO:2) con una proteína Fc. Las células del bazo se fusionaron y se rastreó en los hibridomas originales la presencia de FRCS y ELISA, y posteriormente, los efectos de proliferación, IHC en secciones de tejidos congeladas, y la cinética de los enlaces de disociación. Se seleccionaron aproximadamente 40 clones para su subclonación, basándose en enlaces fuertes y una baja tasa de disociación. Los subclones se expandieron y se purificaron. Los anticuerpos monoclonales purificados se compararon a continuación entre sí mediante filtrado FRCS, inmunofluorescencia y Biacore, evaluándose los efectos in vitro e in vivo sobre la proliferación.

Ensayo FRCS

[0167] Las células se extrajeron con 5 mM EDTA en Tris-HCl (pH 8.0) y se bloquearon mediante centrifugado en HESS con un 3% de FBS inactivado por calor, 1% de suero de cabra normal (Sigma), y BSA al 1% a 4° C durante 5 minutos. Las células se incubaron durante una hora a 4° C con anti-GPR64-FITC (10 µg/ml; R&D Systems) en tampón FRCS (PBS conteniendo 0,1% BSA). El exceso de mAb se eliminó por centrifugado, y las células volvieron a suspenderse en una solución tampón de FRCS que contenía yoduro de propidio (1 µg/ml). Se midió la intensidad de la fluorescencia en un FACScan (Becton Dickinson). La prueba cuantitativa de FRCS se realizó de forma similar, aunque se utilizó una concentración de saturación de anti-GPR64-FITC (50 µg/ml) en las células y en los lechos celulares tratados de forma similar con Quantum Simply (Sigma), una mezcla de cuatro poblaciones de lechos de agarosa con un contenido conocido de enlaces de anticuerpos. La cuantificación del emplazamiento de enlace de anticuerpos se llevó a cabo comparando el MFI de cada línea celular con el de las poblaciones de los lechos celulares de Quantum Simply y se corrigieron los efectos no específicos descritos (Brockhoff et al., 1994, Cytometry 17: 75-83). Los experimentos se realizaron dos veces por triplicado.

Análisis cinético mediante resonancia de plasmón superficial

[0168] Las medidas de la cinética entre la proteína de fusión humana GPR64-Fc y los anticuerpos monoclonales GPR64 se realizaron utilizando BiAcCore 3000 (BiAcCore, Suecia). Los mAbs Anti-GPR64 se inmovilizaron con 100 RUs en un chip detector de nivel de investigación CM5 con los the BiAcCore de acoplamiento de aminos (N-etil-N'-dimetilaminopropilcarbodiimida, EDC; N-hidroxisuccinimida, NHS; y etanolamina HCl, pH 8,5). Los ensayos se llevaron a cabo a un caudal de 30 µl/min a temperatura ambiente. La fase de asociación de tres minutos de cada GPR64-Fc fue seguida por diez minutos de inyección de solución tampón circulante (10mM Hepes, 300mM de cloruro sódico, 3mM EDTA, 0,05% P-20, pH 7,4) para controlar la disociación. La superficie de mAb se regeneró con 25mM de NaOH. La cinética de enlace de cada par GPR64-mAb se calculó a partir de los datos obtenidos a seis concentraciones diferentes (2048nM, 512nM, 128nM, 32nM, 8nM, 2nM) de analito GPR64-Fc, utilizando el programa BIAevaluate. Se aplicó una doble referencia a cada análisis para eliminar las respuestas de fondo de la superficie de referencia y el control exclusivo de la solución reguladora. La afinidad del (K_D) del enlace se obtuvo mediante el ajuste simultáneo de las fases de asociación y disociación del sensorgrama procedente de la serie de concentraciones de analito, utilizando el modelo de analito bivalente de BIAevaluate software.

Ensayo de Inmunofluorescencia e internalización

[0169] Una serie de células cultivadas en cubreobjetos se enfriaron con hielo en un medio de crecimiento durante 10 minutos. El medio de crecimiento se substituyó por un medio que contenía mAb anti-GPR64 (10 µg/ml) a 4° C durante 1 h. El enlace del anticuerpo se detectó utilizando el anticuerpo secundario anti-ratón de cabra AlexaFluor-488 (disolución de 1:2200 en medio de crecimiento helado; sondas moleculares). Las células se lavaron en tres ocasiones con PBS, se fijaron utilizando formaldehído UltraPure al 5% en PBS durante 40 min y se lavaron otras dos veces utilizando PBS. Los cubreobjetos se montaron utilizando Permafluor (Coulter) para su visualización.

[0170] Para probar la internalización de los anticuerpos GPR64, las células se introdujeron en una incubadora a 37° C durante 1 h y a continuación se situaron en hielo durante 1 h en una solución de bloqueo (20 µg/ml de anticuerpo anti-ratón puro de Cabra en el medio). Tras su lavado en PBS, las células se fijaron en formaldehído ultrapuro al 5%. A continuación, las células se lavaron con Triton X-1000 al 0.5% y se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra AlexaFluor-488 (disolución de 1:2200 en medio de crecimiento helado; sondas moleculares). La visualización de los anticuerpos internalizados se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

Ensayo de proliferación In Vitro (Ensayo MTT).

[0171] Las líneas celulares se situaron en placas con una densidad de 2500 células/pocillo en 96 placas pocillo, dejándose que se recuperasen durante una noche en un medio sin rojo de fenol de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) que contenía FBS al 10% y suplementos (medio de crecimiento). Las células se hicieron reaccionar durante 1 h con mAb o ADC (dos veces en un volumen de 50 µl) en IMDM a las concentraciones indicadas. A continuación, las células se lavaron dos veces con el medio de crecimiento y se dejaron proliferar en un medio de crecimiento fresco durante 4 días, valorándose a continuación la viabilidad celular mediante el ensayo de proliferación celular acuoso no radioactivo CellTiter 96 (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los estudios de crecimiento se llevaron a cabo por triplicado al menos en tres ocasiones.

Resultados

[0172] La figura 5 muestra una tabla en la que se muestran los resultados compilados en 42 mAbs (incluyendo el GPR64-18 descrito en el ejemplo 2). Los resultados incluyen diversas medidas de afinidad de enlace de anticuerpo incluyendo la titración FRCS (es decir, EC₅₀), la resonancia de plasmón superficial (i.e. Biacore), inmunohistoquímicas (IHC) y de inmunofluorescencia (IF). Curiosamente, muchos de estos anticuerpos monoclonales son isotipos del IgG2a y del IgG2b. Lo que es más importante, muchos de estos anticuerpos presentan unos bajos valores de EC₅₀ mediante el ensayo FRCS, y unos valores nanomolares o subnanomolares K_D de Biacore.

[0173] Los ensayos de inmunofluorescencia (IF) mostraron una tinción de la superficie celular, que se vio confirmada por el ensayo FRCS. Es importante destacar que el ensayo IF diseñado para visualizar la internalización de los anticuerpos monoclonales de la GPR64 mostró un desplazamiento de la tinción fluorescente desde la superficie de la célula al interior de la misma. Este resultado confirma que los mAbs GPR64 están internalizados, lo que resulta crítico para la utilización de estos mAbs en un método terapéutico de conjugado anticuerpo-fármaco (ADC).

[0174] De este modo, se ha generado un elevado número de anticuerpos monoclonales purificados anti-GPR64, que presentan unas propiedades de enlace deseables para su utilización como posibles anticuerpos terapéuticos para enfrentarse al crecimiento tumoral y otras enfermedades degenerativas asociadas a la expresión de la GPR64. También se evaluó el efecto de los mAbs de la GPR64 purificados sobre el crecimiento *in vitro* utilizando un ensayo estándar MTT durante 4 días. Los resultados muestran que el mAbs purificado por sí solo ejerce poco o ningún efecto sobre el crecimiento celular en este ensayo *in vitro*. No obstante, como se describe en el ejemplo 2 y más adelante, los efectos sobre el crecimiento pueden detectarse mediante ensayos *in vivo*.

Ejemplo 5: Validación IHC de la GPR64 como Diana para el cáncer de ovario

[0175] Las micromatrices de tejidos correspondientes a tejidos normales y las muestras de cáncer de ovario se obtuvieron de Clinomics Biosciences, Inc. (Pittsfield, MA). Se llevó a cabo una prueba IHC sobre los tejidos fijados con formalina en bloques de parafina, utilizando los métodos estándar anteriormente descritos (Henshall et al., 2003, Oncogene 22:6005-6012). La recuperación del antígeno inducida por calor se llevó a cabo en una solución de recuperación "Dako Target" durante 15 minutos en una olla a presión. A continuación, las muestras se incubaron con un anticuerpo específico de la GPR64 (por ejemplo, GPR64-101) o con el IgG1 de ratón de control [TIB191, un mAb del ratón anti-trinitrofenol (clon hibridoma 1876.11, ATCC)] durante 30 minutos. Los enlaces del anticuerpo se detectaron utilizando un anticuerpo secundario biotinilado [IgG anti-ratón de cabra (3 mg/ml, 30 minutos; Jackson ImmunoResearch)], y se desarrollaron utilizando el Kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories) y DAB estable (diaminobencidina y H₂O₂; Research Genetics). La tinción se llevó a cabo utilizando el DAKO Autostainer a temperatura ambiente.

[0176] Como se aprecia en la figura 6, la tinción con IHC de diversas muestras de cáncer de ovario con el anticuerpo GPR64-101 (OAM6#101 en la figura) reveló una elevada expresión de la proteína GPR64. También es de destacar

que, como se muestra en la figura 7, la GPR64-101 (OAM6#101 en la figura) no tiñó de forma significativa ninguno de los tejidos normales sometidos al ensayo, a excepción de una cierta tinción de las glándulas paratiroides.

[0177] Los datos que se muestran en las figuras 6 y 7 coinciden con el perfil de expresión de la GPR64 determinado utilizando micromatrices de oligonucleótidos (GeneChip) y confirman la elevada expresión de la GPR64 en el cáncer de ovario, comparado con el atlas del cuerpo normal. Por consiguiente, estos estudios IHC validan también la GPR64 como una diana del cáncer de ovario.*****

Ejemplo 6: Efecto del mAbs anti-GPR64 purificado en un modelo de tratamiento del xenoinjerto H460 *in vivo*

[0178] Se sometió a prueba un mAbs GPR64 que presentaba una elevada afinidad (GPR64-18, GPR64-61, GPR64-62, GPR64-81, GPR64-93, y GPR64-95) en el modelo de xenoinjerto H460 *in vivo* de acuerdo con el mismo método general que se ha descrito en el Ejemplo 2. Se permitió que los tumores H460 alcanzasen un tamaño de — 100 mm³ antes de someterlos a tratamiento con 10 mg/kg del anticuerpo desnudo purificado GPR64, o con un isotipo de control TIB191.

[0179] Como se muestra en la figura 8, aunque ninguno de los anticuerpos impidió por completo el crecimiento tumoral en los xenoinjertos H460, los anticuerpos con mayor afinidad GPR64-81 (OAM6#81α en la figura) y GPR64-93 (OAM6#93α en la figura) presentaron una mayor eficacia *in vivo* a la hora de hacer más lento el crecimiento.

Ejemplo 7: Mapeado del epítipo del mAbs GPR64 purificado

[0180] El mapeado del epítipo se llevó a cabo mediante un ensayo competitivo FRCS. Resumidamente, se incubaron células H460 con 25 µg/ml de anticuerpo sin etiquetar durante 1 hora en hielo, y tras dicho período se añadieron diversas cantidades de anticuerpo etiquetado con FTTC. Al cabo de 30 minutos adicionales, las células se lavaron una vez y se midió la fluorescencia mediante citometría de caudal. Todos los datos fueron confirmados por Biacore.

[0181] En los resultados se identifican cuatro epítopos diferentes. Resulta interesante observar que los dos mAbs anti-GPR64 (GPR64-81, y GPR64-93) que presentan la mayor eficacia *in vivo* reconocen dos epítopos diferentes en el GPR64. El GPR64-101 también se une a su propio epítipo, pero el GPR64-18, -61, -62, -65, -95, y -99 se unen todos ellos al mismo epítipo.

Ejemplo 8: Inmunizaciones basadas en células

[0182] Las inmunizaciones basadas en células utilizando transfectantes de la línea celular singénica Balb/c 3T12 se utilizaron para generar mAbs en toda la longitud del antígeno GPR64. La baja expresión del GPR64 natural y la elevada titración de fondo del 3T12 arrojaron generalmente como resultado unas bajas titraciones específicas del GPR64. Para aumentar las titraciones específicas del GPR64, se diseñó un mutante DRY box del GPR64 en 3T12. El motivo DRY box participa en el enlace del GPR64 con su proteína señaladora G. Se cree que el mutante DRY box desacopla este mecanismo de señalización y por tanto permite una mayor expresión del GPR64. Se demostró mediante análisis FRCS que el 3T12 diseñado mediante el mutante DRY box presentaba GPR64 una expresión 20 veces más elevada que en el caso de las células naturales. Los mutantes DRY box de 3T12 se utilizaron en una estrategia de inmunización pasiva. Los títulos de suero resultantes para el GPR64 eran mucho más elevados y presentaban menos fondo que las inmunizaciones originales basadas en células naturales.

[0183] Utilizando la descripción anteriormente descrita de mutantes DRY box e inmunización pasiva se pueden producir muestras de mAbs GPR64 en toda la longitud de la proteína que pueden presentar unas afinidades de unión y eficacia mucho más elevadas en relación con la inhibición del crecimiento tumoral.

Ejemplo 9: Conjugados anticuerpo GPR64-fármaco en células H460

[0184] Los anticuerpos GPR64 se acoplaron a la toxina de microtúbulo Auristatina E (VCAE) y se comprobó su capacidad para matar células H460 *in vitro*.

[0185] Se preparó un ADC Anti-GPR64-VC-MMAE (mono-metil auristatina E enlazado a valina-citrulina) en la forma anteriormente descrita (Doronina et al., 2003, Nat Biotechnol. 21:778-784). En resumen, un mAb anti-GPR64 purificado o un isotipo de control (TIB191) se redujo con 10 mM de DTT, y el contenido de tiol se determinó midiendo el A412 tras la incubación con el reactivo de Ellman y su cálculo posterior. Se incubó una solución equimolar de maleimida-VC-MMAE [8 mM en DMSO (Sigma)] en acetonitrilo frío (concentración final del 20%) con un mAb reducido durante 30 min a 4° C. El VC-MMAE no conjugado se eliminó mediante diálisis a 4° C en PBS y se filtró. El mAb conjugado se cuantificó utilizando A280/Á260, determinándose la cantidad de agragado en relación con el monómero, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño. Por último, se llevó a cabo una espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción láser asistida por matriz para determinar el número de moléculas de fármaco por mAb.

[0186] Como se muestra en la figura 9, se comprobó una muestra de 18 conjugados GPR64 mAb-VCAE diferentes frente a células H460 en un ensayo MTT de 4 días (como se describe en el Ejemplo 4 anterior). Los resultados

muestran que un subconjunto de los ADCs GPR64 mAb que incluya GPR64-18, -81, -82, -93, y -95 inhibe de forma significativa la supervivencia de las células H460.

[0187] Los de los anteriores ADCs GPR64-81 y GPR64-93 se sometieron a pruebas adicionales de inhibición del crecimiento del xenoinjerto H460 *in vivo* de acuerdo con el método que acaba de describirse en el ejemplo 6. Como se muestra en la figura 10, ambos ADCs GPR64-VCAE ralentizan significativamente el crecimiento tumoral, pero ninguno ejerce un efecto completo.

[0188] Se entiende que los ejemplos que se han descrito anteriormente no sirven en modo alguno para limitar el alcance de esta invención sino que se presentan con fines ilustrativos.

[0189] Todos los números UniGene de identificación del cluster, así como los números de acceso que se facilitan en este documento se refieren a la base de datos de secuencias GenBank y las secuencias de los números de acceso quedan expresamente incorporadas por referencia al presente documento. GenBank es conocida en la técnica, véase, por ejemplo, Benson, DA, et al., *Nucleic Acids Research* 26:1-7 (1998). Las secuencias también se encuentran disponibles en otras bases de datos, *por ejemplo*, El Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) y la base de datos del ADN de Japón (DDBJ).

Depósito de materiales

[0190] Los siguientes materiales se han depositado en la American Type Culture Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

Material	Nº depós. ATCC	Fecha depósito
Hibridoma OAM6#81 (produce mAb GPR64-81)		18 dic. 2003
Hibridoma OAM6#93 (produce mAb GPR64-93)		18 dic. 2003

[0191] Este depósito se realizó de acuerdo con las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes y su correspondiente reglamento (El Tratado de Budapest). De este modo se garantiza el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante los 30 años siguientes a la fecha del depósito. El depósito será facilitado por ATCC de acuerdo con los términos y condiciones del Tratado de Budapest, y sujeto a un acuerdo formalizado por Protein Design Labs, Inc. y ATCC, que garantiza la disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie del cultivo para el público, sujeto a la correspondiente patente estadounidense o a la divulgación pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, lo que antes acontezca, y garantiza la disponibilidad de la progenie a las personas designadas por el Comisario Patentes y Marcas de los Estados Unidos, de acuerdo con 35 U.S.C. § 122 y las reglas del Comisario en virtud del mismo (incluyendo 37 CFR § 1.14 haciendo referencia específica a 886 OG 638)

[0192] la cesionaria de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito muriese, se perdiese o resultase destruido en unas adecuadas condiciones de cultivo, los materiales serán sustituidos rápidamente por otros iguales, previa notificación. La disponibilidad de los materiales depositados no deberá interpretarse como una licencia para poner en práctica la invención contraviniendo el derecho otorgado bajo la autoridad de cualquier gobierno, a tenor de su legislación en materia de patentes.

[0193] El alcance de la presente invención no resultará limitado por el constructo depositado, ya que la realización depositada se facilita como una mera ilustración de determinados aspectos de la invención, y cualesquiera constructos que sean funcionalmente equivalentes se encuentran incluidos dentro del alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que se une al mismo epítopo de un polipéptido GPR64 como un GPR64-18, donde el GPR64-18 comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:17 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID No:18.
2. Anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada con una homología del 95% o superior con SEQ ID NO:17 y una secuencia de región variable de cadena ligera con una homología del 95% o superior con SEQ ID NO:18.
3. Anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es GPR64-18.
4. Anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se une al polipéptido de la GPR64 con una afinidad de unión de menos de 0.01 μM .
5. Anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se conjuga con un grupo efector, donde el grupo efector se selecciona de entre una etiqueta fluorescente, un radioisótopo o un agente citotóxico.
6. Anticuerpo de la reivindicación 5, donde el grupo efector es un agente citotóxico seleccionado de entre el grupo consistente en la cadena A de la difteria, cadena A de la exotoxina, cadena A del ricino, cadena A de la abrina, curcina, crotina, fenomicina, neomicina y auristatina.
7. Anticuerpo de la reivindicación 6, donde el agente citotóxico es la auristatina.
8. Anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
9. Anticuerpo de la reivindicación 8, donde el fragmento de anticuerpo se selecciona de entre el grupo formado por Fab, Fab', F(ab')₂, fragmentos Fv, rIgG, di-anticuerpos de cadena única y anticuerpos multiespecíficos.
10. Anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.
11. Anticuerpo de la reivindicación 1, donde el polipéptido GPR64 se encuentra en una célula cancerosa.
12. Composición farmacológica que comprende un excipiente farmacológicamente aceptable y el anticuerpo de la reivindicación 1.
13. Composición farmacológica de la reivindicación 12, en la que el anticuerpo está conjugado con un radioisótopo o un agente citotóxico.
14. Composición farmacológica de la reivindicación 13, donde el agente citotóxico es la auristatina.
15. Composición farmacológica de la reivindicación 12, donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
16. Anticuerpo de la reivindicación 1 para utilizarse con un método de inhibición de la proliferación celular del cáncer de ovario en un paciente.
17. Anticuerpo para utilizarse conforme a la reivindicación 16, donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
18. Anticuerpo para utilizarse conforme a la reivindicación 17, donde el paciente es un primate.
19. Anticuerpo para utilizarse conforme a la reivindicación 16, donde el paciente está sometido a un régimen terapéutico para el tratamiento del cáncer de ovario metastásico.
20. Anticuerpo para utilizarse conforme a la reivindicación 16, donde el paciente sufre o se sospecha que sufre cáncer de ovario metastásico.
21. Anticuerpo monoclonal que se une con un GPR64 en una célula tumoral, donde dicho anticuerpo se une a un epítopo en una secuencia que va desde el aminoácido 1 hasta el aminoácido 588 de SEQ ID NO:2 inclusive, con una afinidad de unión inferior a 0,01 μM , donde el anticuerpo comprende una región de cadena variable pesada con una homología del 95% o superior con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:17 y una región de cadena variable ligera con una homología del 95% o superior con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 18.

SECUENCIA DEL NUCLEÓTIDO GPR64 (SEQ ID NO: 1)

Nombre del Gen: Receptor acoplado a la proteína G 64

Número Unigen: Hs.421137

Número de muestreo Sondas: AA435577

5 Número de muestreo ácido nucleico: NM_005756

Secuencia de codificación: 73-3117(las secuencias subrayadas corresponden a los codones inicial y final)

1	11	21	31	41	51	
AGCCAGCCCG	AGGACGCGAG	CGGCAGGTGT	GCACAGAGGT	TCTCCACTTT	GTTTTCTGAA	60
CTCGCGGTCA	GGATGGTTTT	CTCTGTCAGG	CAGTGTGGCC	ATGTTGGCAG	AACTGAAGAA	120
GTTTTACTGA	CGTTCAAGAT	ATTCCTTGTC	ATCATTGTGC	TTCATGTCGT	TCTGGTAACA	180
TCCCTGGAAG	AAGATACTGA	TAATTCCAGT	TTGTCAACCAC	CACCTGCTAA	ATTATCTGTT	240
GTCAGTTTTC	CCCCCTCCTC	CAATGAGGTT	GAAACAACAA	GCCTCAATGA	TGTTACTTTA	300
AGCTTACTCC	CTTCAAACGA	AACAGAAAAA	ACTAAAATCA	CTATAGTAAA	AACCTTCAAT	360
GCTTCAGGCG	TCAAACCCCA	GAGAAATATC	TGCAATTTGT	CATCTATTTG	CAATGACTCA	420
GCATTTTFTA	GAGGTGAGAT	CATGTTTCAA	TATGATAAAG	AAAGCACTGT	TCCCAGAAT	480
CAACATATAA	CGAATGGCAC	CTTAACCTGGA	GTCCTGTCTC	TAAGTGAATT	AAAACGCTCA	540
GAGCTCAACA	AAACCCTGCA	AACCCTAAGT	GAGACTTACT	TTATAATGTG	TGCTACAGCA	600
GAGGCCCAAA	GCACATTAAA	TTGTACATTC	ACAATAAAAC	TGAATAATAC	AATGAATGCA	660
TGTGCTGCAA	TAGCCGCTTT	GGAAAGAGTA	AAGATTCGAC	CAATGGAACA	CTGCTGCTGT	720
TCTGTCAGGA	TACCCTGCCC	TTCTTCCCCA	GAAGAGTTGG	GAAAGCTTCA	GTGTGACCTG	780
CAGGATCCCA	TTGTCTGTCT	TGCTGACCAT	CCACGTGGCC	CACCATTTTC	TTCCAGCCAA	840
TCCATCCCA	TGGTGCTCTG	GGCCACTGTG	CTTTCACAGG	TCCCCAAAGC	TACCTCTTTT	900
GCTGAGCCTC	CAGATTATTC	ACCTGTGACC	CACAATGTTC	CCTCTCCAAT	AGGGGAGATT	960
CAACCCCTTT	CACCCAGGCC	TTCAGCTCCC	ATAGCTTCCA	GCCCTGCCAT	TGACATGCCC	1020
CCACAGTCTG	AAACGATCTC	TTCCCTATG	CCCCAAACCC	ATGTCTCCGG	CACCCACCT	1080
CCTGTGAAAG	CCTCATTTTC	CTCTCCACC	GTGTCTGCCC	CTGCGAATGT	CAACACTACC	1140
AGCGCACCTC	CTGTCCAGAC	AGACATCGTC	AACACCAGCA	GTATTTCTGA	TCTTGAGAAC	1200
CAAGTGTGTC	AGATGGAGAA	GGCTCTGTCC	TTGGGCAGCC	TGGAGCCTAA	CCTCGCAGGA	1260
GAAATGATCA	ACCAAGTCAG	CAGACTCCTT	CATTCCCCGC	CTGACATGCT	GGCCCCTCTG	1320
GCTCAAAGAT	TGCTGAAAGT	AGTGGATGAC	ATTGGCCTAC	AGCTGAACTT	TTCAAACACG	1380
ACTATAAGTC	TAACCTCCCC	TTCTTTGGCT	CTGGCTGTGA	TCAGAGTGAA	TGCCAGTAGT	1440
TTCAACACAA	CTACCTTTGT	GGCCCAAGAC	CCTGCAAAATC	TTCAGGTTTC	TCTGGAAACC	1500
CAAGCTCCTG	AGAACAGTAT	TGGCACAATT	ACTCTTCCTT	CATCGCTGAT	GAATAATTTA	1560
CCAGCTCATG	ACATGGAGCT	AGCTTCCAGG	GTTCAAGTTCA	ATTTTTTTGA	AACACCTGCT	1620
TTGTTTCAGG	ATCCTTCCCT	GGAGAACCCTC	TCTCTGATCA	GCTACGTCAT	ATCATCGAGT	1680
GTTGCAAACC	TGACCGTCAG	GAACCTTGACA	AGAAACGTGA	CAGTCACATT	AAAGCACATC	1740
AACCCGAGCC	AGGATGAGTT	AACAGTGAGA	TGTGTATTTT	GGGACTTGGG	CAGAAATGGT	1800
GGCAGAGGAG	GCTGGTCAGA	CAATGGCTGC	TCTGTCAAAG	ACAGGAGATT	GAATGAAACC	1860
ATCTGTACCT	GTAGCCATCT	AACAAGCTTC	GGCGTTCTGC	TGGACCTATC	TAGGACATCT	1920
GTGCTGCCTG	CTCAAATGAT	GGCTCTGACG	TTCAATTACAT	ATATTGGTTG	TGGGCTTTCA	1980
TCAATTTTTC	TGTCAGTGAC	TCTTGTAACC	TACATAGCTT	TTGAAAAGAT	CCGGAGGGAT	2040
TACCCTTCCA	AAATCCTCAT	CCAGCTGTGT	GCTGCTCTGC	TTCTGCTGAA	CCTGGTCTTC	2100
CTTCTGGACT	CGTGGATTGC	TCTGTATAAG	ATGCAAGGCC	TCTGCATCTC	AGTGGCTGTA	2160
TTTCTTCAAT	ATTTTCTCTT	GGTCTCATTC	ACATGGATGG	GCCTAGAAGC	ATTCCATATG	2220
TACCTGGCCC	TTGTCAAAGT	ATTTAATACT	TACATCCGAA	AATACATCCT	TAAATTCTGC	2280
ATTGTCGGTT	GGGGGTACC	AGCTGTGGTT	GTGACCATCA	TCCTGACTAT	ATCCCCAGAT	2340
AACTATGGGC	TTGGATCCTA	TGGGAAATTC	CCCAATGGTT	CACCGGATGA	CTTCTGCTGG	2400
ATCAACAACA	ATGCAGTATT	CTACATTACG	GTGGTGGGAT	ATTTCTGTGT	GATATTTTGT	2460
CTGAACGTCA	GCATGTTTCA	TGTGGTCCTG	GTTCAGCTCT	GTCGAATTAA	AAAGAAGAG	2520
CAACTGGGAG	CCCAGCGAAA	AACAGTATT	CAAGACCTCA	GGAGTATCGC	TGGCCTTACA	2580
TTTTTACTGG	GAATAACTTG	GGGCTTTGCC	TTCTTTGCCT	GGGGACCAGT	TAACGTGACC	2640
TTCATGTATC	TGTTTGCCAT	CTTTAATACC	TTACAAGGAT	TTTTCATATT	CATCTTTTAC	2700

FIG. 1

TGTGTGGCCA	AAGAAAATGT	CAGGAAGCAA	TGGAGGCGGT	ATCTTTGTTG	TGGAAAGTTA	2760
CGGCTGGCTG	AAAATTCTGA	CTGGAGTAAA	ACTGCTACTA	ATGGTTTAAA	GAAGCAGACT	2820
GTAAACCAAG	GAGTGTCCAG	CTCTTCAAAT	TCCTTACAGT	CAAGCAGTAA	CTCCACTAAC	2880
TCCACCACAC	TGCTAGTGAA	TAATGATTGC	TCAGTACACG	CAAGCGGGAA	TGGAAATGCT	2940
TCTACAGAGA	GGAATGGGGT	CTCTTTTAGT	GTTTCAAGATG	GAGATGTGTG	CCTTCACGAT	3000
TTCACTGGAA	AACAGCACAT	GTTTAACGAG	AAGGAAGATT	CCTGCAATGG	GAAAGGCCGT	3060
ATGGCTCTCA	GAAGGACTTC	AAAGCGGGGA	AGCTTACACT	TTATTGAGCA	AATGTGATTC	3120
CTTTCTTCTA	AAATCAAAGC	ATGATGCTTG	ACAGTGTGAA	ATGTCCAATT	TTACCTTTTA	3180
CACAATGTGA	GATGTATGAA	AATCAACTCA	TTTTATTCTC	GGCAACATCT	GGAGAAGCAT	3240
AAGCTAATTA	AGGGCGATGA	TTATTATTAC	AAGAAGAAAC	CAAGACATTA	CACCATGGTT	3300
TTTAGACATT	TCTGATTGGG	TTTCTTATCT	TTCAATTTAT	AAGAAGGTTG	GTTTTAAACA	3360
ATACACTAAG	AATGACTCCT	ATAAAGAAAA	CAAAAAAAGG	TAGTGAACCTT	TCAGCTACCT	3420
TTTAAAGAGG	CTAAGTTATC	TTTGATAACA	TCATATAAAG	CAACTGTTGA	CTTCAGCCGT	3480
TTGGTGAGTT	TAGTTGTGCA	TGCCTTTGTT	GTATATAAGC	TAAATTCTAG	TGACCCATGT	3540
GTCAAAAATC	TTACTTCTAC	ATTTTTTTGT	ATTTATTTTC	TACTGTGTAA	ATGTATTCTT	3600
TTGTAGAATC	ATGGTTGTTT	TGTCTCACGT	GATAATTCAG	AAAATCCTTG	CTCGTTCCGC	3660
AAATCCTAAA	GCTCCTTTTG	GAGATGATAT	AGGATGTGAA	ATACAGAAAC	CTCAGTGAAA	3720
TCAAGAAATA	ATGATCCCAG	CCAGACTGAG	AAAAATGTAAG	CAGACAGTGC	CACAGTTAGC	3780
TCATACAGTG	CCTTTGAGCA	AGTTAGGAAA	AGATGCCCCC	ACTGGGCAGA	CACAGCCCTA	3840
TGGGTCATGG	TTTGACAAAC	AGAGTGAGAG	ACCATATTTT	AGCCCCACTC	ACCTCTTTGG	3900
GTGCACGACC	TGTACAGCCA	AACACAGCAT	CCAATATGAA	TACCCATCCC	CTGACCCGAT	3960
CCCCAGTAGT	CAGATTATAG	AATCTGCACC	AAGATGTTTA	GCTTTATACC	TTGGCCACAG	4020
AGAGGGAGTA	ACTGTCATCC	AGACCATGTG	TCAGGAAAAT	TGTGAACGTA	GATGAGGTAC	4080
ATACACTGCC	GCTTCTCAAA	TCCCCAGAGC	CTTTAGGAAC	AGGAGAGTAG	ACTAGGATTC	4140
CTTCTCTTAA	AAAGGTACAT	ATATATGGAA	AAAAATCATA	TTGCCGTTCT	TTAAAAGGCA	4200
ACTGCATGGT	ACATGTGTTGA	TTGTTATGAC	TGGTACACTC	TGGCCCAGCC	AGAGCTATAA	4260
TTGTTTTTTA	AATGTGTCTT	GAAGAATGCA	CAGTGACAAG	GGGAGTAGCT	ATTGGGAACA	4320
GGGAACGTGC	CTACACTGCT	ATTGTTGCTA	CATGTATCGA	GCCTTGATTG	CTCCTAGTTA	4380
TATACAGGGT	CTATCTTGCT	TCCTACCTAC	ATCTGCTTGA	GCAGTGCCTC	AAGTACATCC	4440
TTATTAGGAA	CATTTCAAAC	CCCTTTTAGT	TAAGTCTTTC	ACTAAGGTTT	TCTTGCGATAT	4500
ATTTCAAGTG	AATGTTGGAT	CTCAGACTAA	CCATAGTAAT	AATACACATT	TCTGTGAGTG	4560
CTGACTTGTC	TTTGCAATAT	TTCTTTTCTG	ATTTATTTAA	TTTTCTTGTA	TTTATATGTT	4620
AAAATCAAAA	ATGTTAAAT	CAATGAAATA	AATTTGCAGT	TAAGA		

5 SECUENCIA DEL NUCLEÓTIDO GPR64 (SEQ ID NO: 1)

Nombre del Gen:	Receptor acoplado a la proteína G 64
Número Unigen:	Hs.421137
Número de muestreo Proteína:	NP_005747.1
Secuencia de la señal:	1-38
Domino GPS:	564-615
Dominios de transmembrana	624-646, 660-682, 688-710, 733-755, 783-805, 828-850, 858-880
Localización celular:	membrana de plasma

1	11	21	31	41	51	
MVFSVRQCGH	VGRTEEVLIT	FKIFLVIICL	HVVLVTSLEE	DTDNSSLSP	PAKLSVVSFA	60
PSSNEVETTS	LNDVTLSELLP	SNETEKTKIT	IVKTFNASGV	KPQRNICNLS	SICNDSAFFR	120
GEIMFQYDKE	STVPQNQHIT	NGTLTGVLISL	SELKRSELNK	TLQTLSEYTF	IMCATAEASQ	180
TLNCTFTIKL	NNTMNACAAI	AALERVKIRP	MEHCCCSVRI	PCPSSPEELG	KLQCDLQDPI	240
VCLADHPRGP	PFSSSQSIPV	VPRATVLSQV	PKATSFABPP	DYSPVTHNVP	SPIGEIQPLS	300
PQPSAPIASS	PAIDMPPQSE	TISSPMPQTH	VSGTPPPVKA	SFSSPTVSAP	ANVNTTSAPP	360
VQTDIVNTSS	ISDLENQVLQ	MEKALSLGSL	EPNLAGEMIN	QVSRLHSP	DMLAPLAQRL	420
LKVVDIGLQ	LNFSNTTISL	TSPSLALAVI	RVNASSFNNT	TFVAQDPANL	QVSLETQAPE	480
NSIGTITLPS	SLMNNLPAHD	MELASRVQFN	FFETPALFQD	PSLENLSLIS	YVISSSVANL	540

Fig. 1

TVRNLTRNVT	VTLKHINPSQ	DELTVRVCVFW	DLGRNGGRGG	WSDNGCSVKD	RRLNETICTC	600
SHLTSFGVLL	DLSRTSVLPA	QMMALTFITY	IGCGLSSIFL	SVTLVTYIAF	EKIRRDYPSK	660
ILIQLCALL	LLNLVFLDS	WIALYKMQGL	CISVAVFLHY	FLLVSFTWMG	LEAFHMYLAL	720
VKVFTYIRK	YILKFCIVGW	GVPVVVTII	LTISPDNYGL	GSYGKFPNGS	PDDFCWINNN	780
AVFYITVVG	FCVIFLLNVS	MFIVVLVQLC	RIKKKKQLGA	QRKTSIQDLR	SIAGLTFLLG	840
ITWGFAFFAW	GPVNVTFMYL	FAIFNTLQGF	FIFIFYCVAK	ENVRKQWRRY	LCCGKLRLAE	900
NSDWSKTATN	GLKKQTVNQG	VSSSSNSLQS	SSNSTNSTTL	LVNNDCSVHA	SGNGMASTER	960
NGVSFSVQNG	DVCLHDFTGK	QHMFNEKEDS	CNGKGRMALR	RTSKRGSLEH	IEQM	

SECUENCIAS DEL NUCLEÓTIDO Y DEL AMINOÁCIDO DE LOS CLONES DEL ANTICUERPO GPR64
(las regiones CDR aparecen en negrita y subrayadas)

SECUENCIAS DEL NUCLEÓTIDO

5

SEQ ID NO: 3: Región de cadena variable pesada del GPR64-1:

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTG
TCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCCTGGAA
CTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGCTGGGCTACATAAGCT
TCAATGATAACACTAACTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCAC
TCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGA
GGACACAGCCACATATTACTGTACAAGGAGGGTGGACTACTGGGGTCAAGGA
ACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

10

SEQ ID NO: 4: Región de cadena variable ligera del GPR64-1:

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAA
GCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACA
ACTATTTACATTGGTATTTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCT
ACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGA
TCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGG
AGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCA
CCAAGCTGGAAATCAAA

15

SEQ ID NO: 5: Región de cadena variable pesada del GPR64-16:

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATAATTGCAGCCCTCCCAGACCCTC
AGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTGTGGGTGT
GAGCTGGATTCTGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTT
ACTGGGATGATGATAAGCGCTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAA
TCTCCAAGGATACCTCCAGAAACCAGGTATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACA
CTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAAGAGTATTCATTATTACGGCC
TTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

20

SEQ ID NO: 6: Región de cadena variable ligera del GPR64-16:

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGA
GTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTACTTAACTGGT
ATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAACTCCTGATCTACTACACATCAAAC
TACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAGCAGATTAT
TCTCTACCATTTGGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAA
CAGGGTAATACGCTTCCTTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCA
AA

25

Fig. 2

SEQ ID NO: 7: Región de cadena variable pesada del GPR64-18:

CAGGTTTCTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTC
AGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGA
GCTGGATTTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTACT
GGGATGATGACAAGCGCTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCC
AAGGATACCTCCAGCAACCTGGTATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACACTGCA
GATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAAGGGAAGTACGACGTGATTACTATGCT
ATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 8: Región de cadena variable ligera del GPR64-18:

AGTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCTTGTCTCAGCAGGAGACAGG
ATTACCATAGCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTAGCTTGGT
ACCAACAGAAGCCAGGGCAGTCTCTAAACTGCTGATAAACTATACATCCAAT
CGCTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATATGGGACGGATT
CACTTTCACCATCAGCACTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTTCTGTCA
GCAGGCTTATAGCTCTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATC
AAACGG

SEQ ID NO: 9: Región de cadena variable pesada del GPR64-20:

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTG
TCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCCTGGAA
CTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCT
ACAGTGATTACACTAGCTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCAC
TCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTGTCAGTTGAATTCTGTGACTACTGA
GGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAAGGGTGGACTACTGGGGTCAAGGA
ACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 10: Región de cadena variable ligera del GPR64-20:

GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCTCAGTCTTGGAGATCAA
GCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACA
CCTAATTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCT
ACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGA
TCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGG
AGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCA
CCACGCTGGAAATCAAA

SEQ ID NO: 11: Región de cadena variable pesada del GPR64-48:

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTG
TCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCCTGGAA
CTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCT
TCAGTGATAGCACTAGCTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCAC
TCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTGTCAGTTGAATTCTGTGACTACTGA
GGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAAGGGGGGACTACTGGGGTCAAGGA
ACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 12: Región de cadena variable ligera del GPR64-48:

GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAA
GCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACA
CCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCT
ACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGG
TCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGG
AGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATCTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCA
CCAAGCTGGAAATCAAA

5 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS:

SEQ ID NO: 13: Región de cadena variable pesada del GPR64-1:

DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWLGYISFND
NTNYPNPSLKSSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCTRRVDYWGQGSVTVS
S

10 SEQ ID NO: 14: Región de cadena variable ligera del GPR64-1:

DVVMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNNYLHWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEI
K

SEQ ID NO: 15: Región de cadena variable pesada del GPR64-16:

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGVGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWD
DDKRYNPSLKSRLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARRVFITAFDYWGQ
GTTLTVSS

15 SEQ ID NO: 16: Región de cadena variable ligera del GPR64-16:

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASODISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSNLHS
GVPSRFSGSGSGADYSLTIGNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 17: Región de cadena variable pesada del GPR64-18:

QVSLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWD
DDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNLVFLKITSVDTADTATYYCARREVRRDYAMDY
WGQGSVTVS

20 SEQ ID NO: 18: Región de cadena variable ligera del GPR64-18:

SIVMTQTPKFLVLSAGDRITIARASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLINYTSNRYT
GVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQAYSSPWTFGGGTKLEIK

25 Fig. 2

- 5 SEQ ID NO: 19: Región de cadena variable pesada del GPR64-20:
DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYS
DYTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARRVDYWGQGTSVTV
SS
- SEQ ID NO: 20: Región de cadena variable ligera del GPR64-20:
DVVMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTTLEIK
- 10 SEQ ID NO: 21: Región de cadena variable pesada del GPR64-48:
DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISFSD
STSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARRGDYWGQGTSVTVS
S
- 15 SEQ ID NO: 22: Región de cadena variable ligera del GPR64-48:
DVVMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHLPWTFGGGTKLEIK

Fig. 2

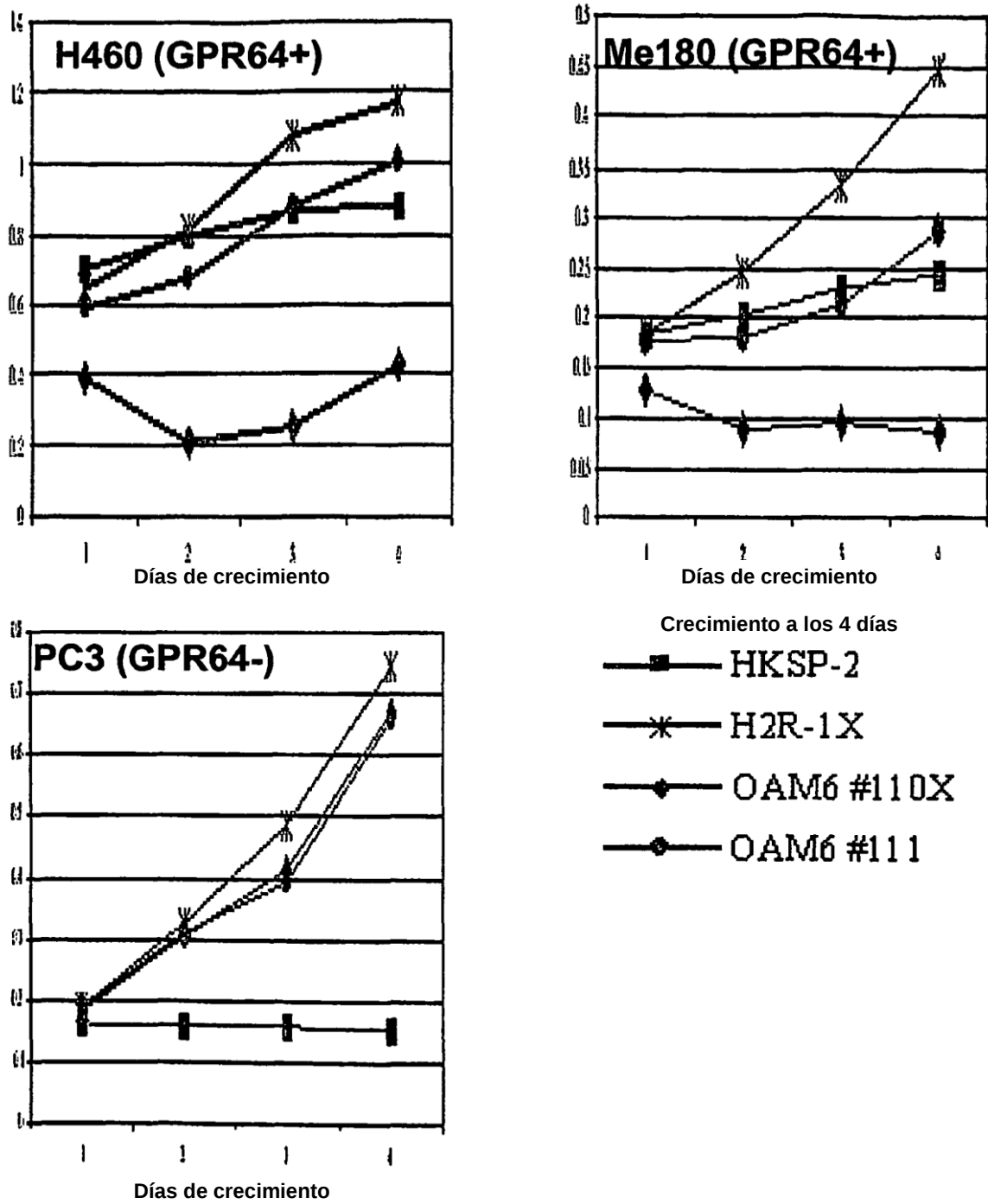


Fig. 3

CÉLULAS GPR+

<u>ARN+</u>	<u>Expresión FACS</u>	<u>Efecto MTT</u>
ME180	+	+
H460	+	+
H520	+	+
C32	+	-
DU145	+	-

CÉLULAS GPR64-

<u>ARN+</u>	<u>Expresión FACS</u>	<u>Efecto MTT</u>	<u>ARN+</u>	<u>Expresión FACS</u>	<u>Efecto MTT</u>
BT474	-	-	HT1376	ND	-
MCF7	-	-	SW780	-	+
NW231	-	-	HCT116	ND	-
H358	-	-	SW620	ND	-
Calu6	-	-	U87	-	-
SKOV3	-	-	A549	-	-
LnCAP	-	+	A375	-	-
			C8161	-	-
			ES2	-	-
			OV-90	ND	-
			OVCAR3	-	-
			PA-1	ND	-
			PC3	-	-

Fig. 4

Mab	FACS (nM)	IHC	IF	Biacore	Isotipo	Mab	ACS (nM)	IHC	IF	Biacore	Isotipo
61a	0.7288	3+	2+	1.09E-09	2b	85a	38.2	2+	2+	2.78E-09	
62a	2.736	2+	2+	1.73E-09	2b	86a	97.98	neg	1+		2a
65a	1.371	2+	2+	1.48E-09	2b	87a	77.04	neg	-		
68a	6.15	2+	1+		1	88a	37.51	neg			
70a	1.831	3+	2+	1.22E-09	2b	89a	107	neg			
80a	0.4032	2+	1+		1	90a	194.6	2+	2+		
67a	246.1	2+	-			91a	4.252	3+	2+		
69a	295.6	neg	-			93a	1.269	2+	1+	8.01E-09	2a
71a	8.159	2+	-		1	94a	87.84	2+	2+	1.66E-07	
72a	130.8	neg	-			95a	28.81	3+	2+	6.29E-10	2b
74a	442.6	2+	-			96a	22.77	2+	-		2a
75a	102.4	2+	2+	9.68E-09		97a		nd			
76a	0.8313	2+	2+	1.62E-10	2a	98a	186.1	nd			
77a	0.9765	3+	1+	2.07E-09	1	99a	10.96	2+	2+	6.97E-09	1
78a	8.955	2+	1+	4.06E-11	2a	100a	42.1	2+	2+	1.81E-09	2a
79a	5.299	3+	1+			101a	4.939	3+	2+	1.46E-10	2a
81a	0.0585	2+	1+	1.38E-08	1	102a	117.2	nd	-		1
82a	5.829	2+	2+	1.61E-09		103a		nd	-		2a
83a	124.7	2+	-			79b		3+			
84a	113.6	2+	-		2a	77b		nd			
18b1	-4.0	2+	1+	2.83E-09	1	104		nd			

Fig. 5

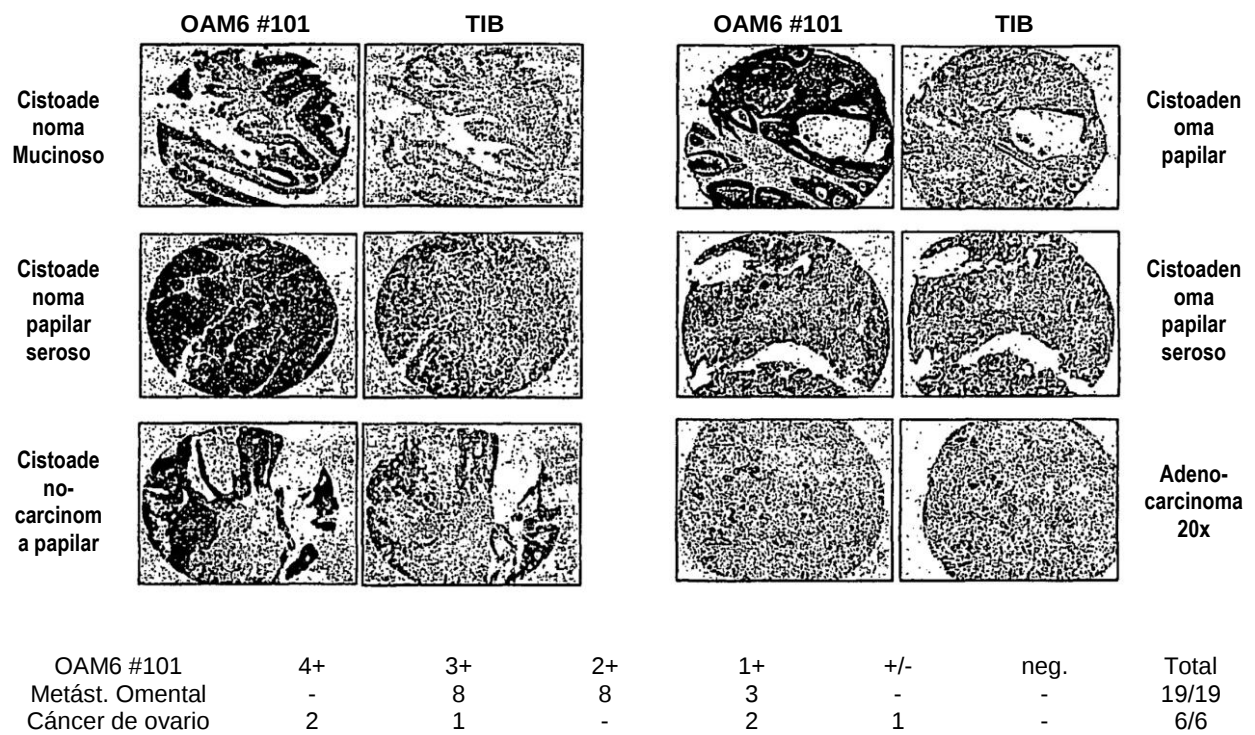


Fig. 6

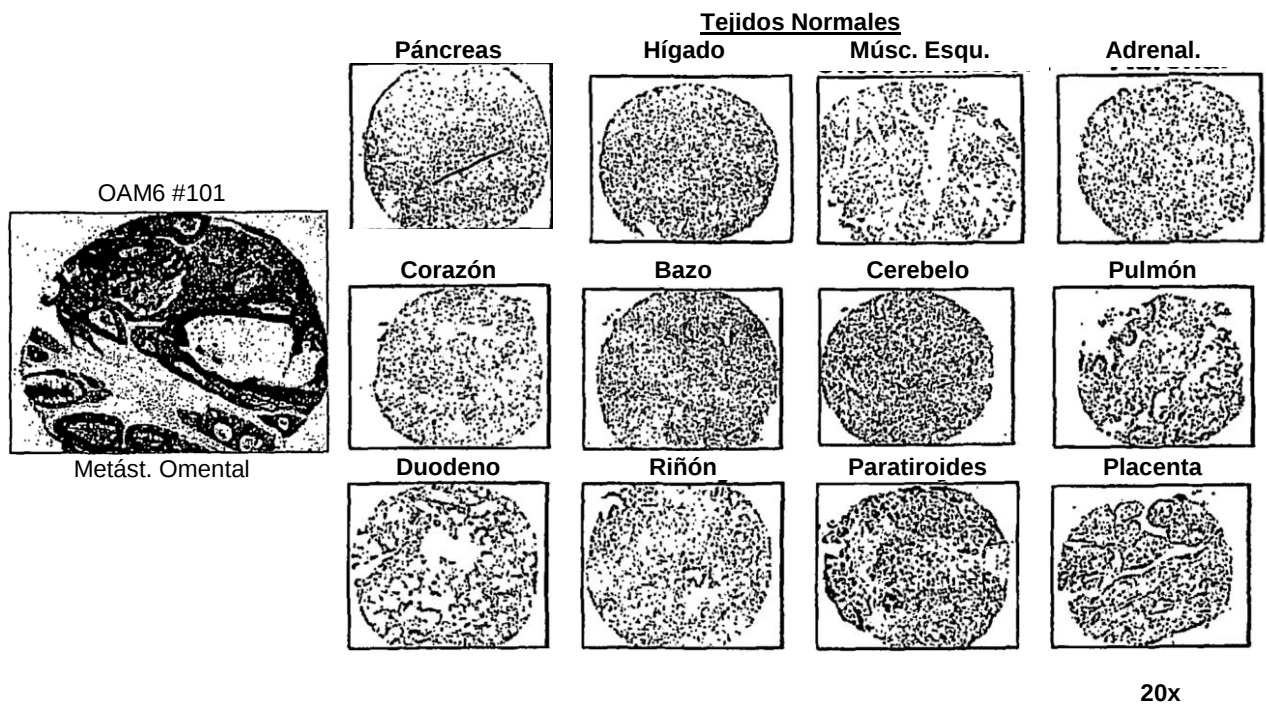
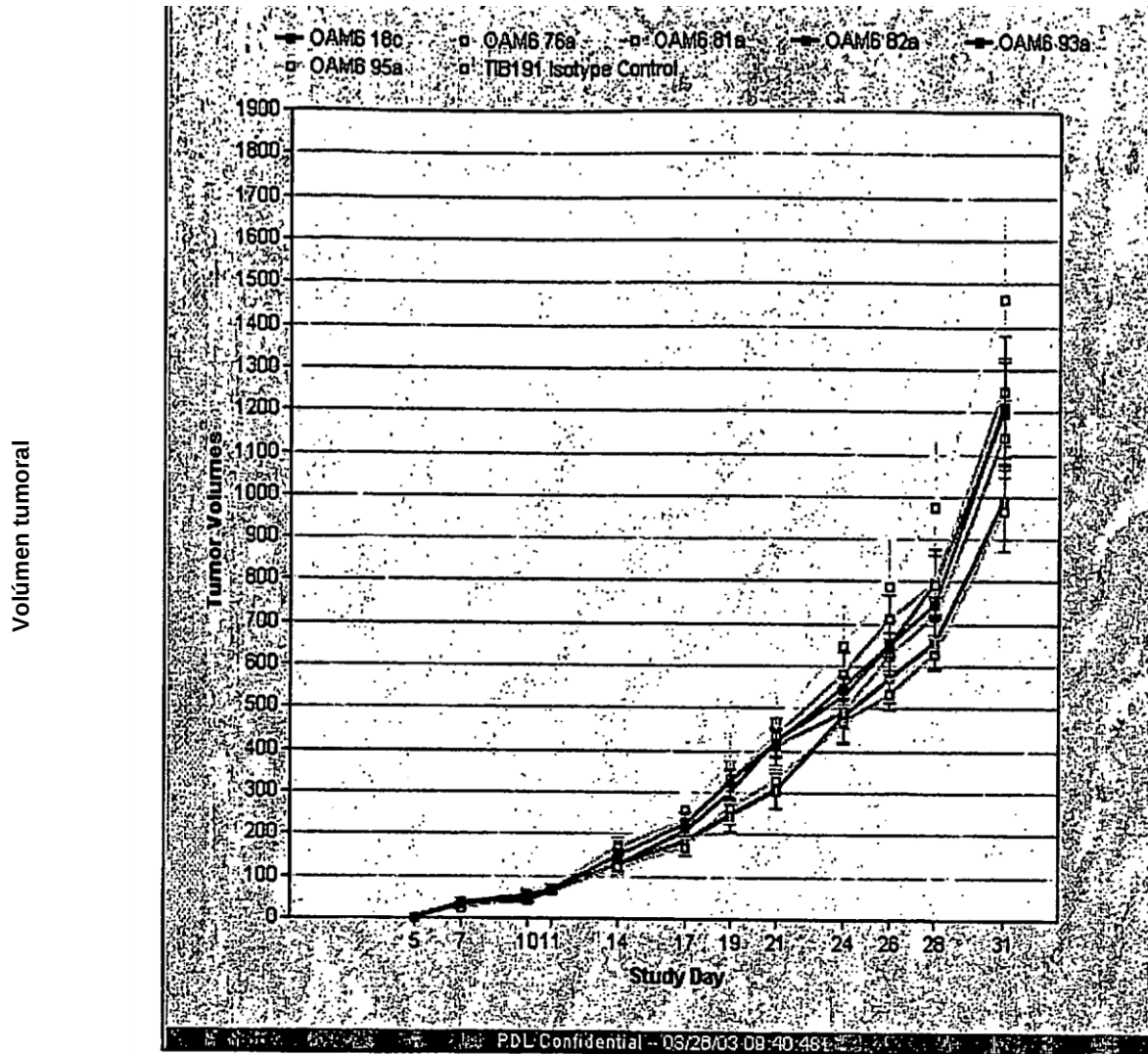
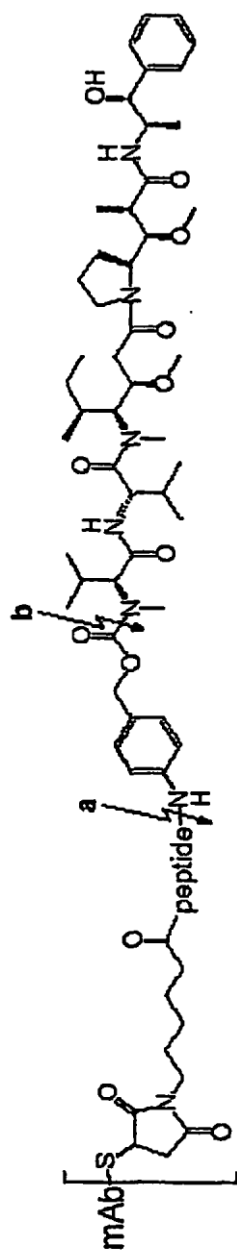


Fig. 7

Volúmenes de Tumor por grupo – OAM6 TEI 002

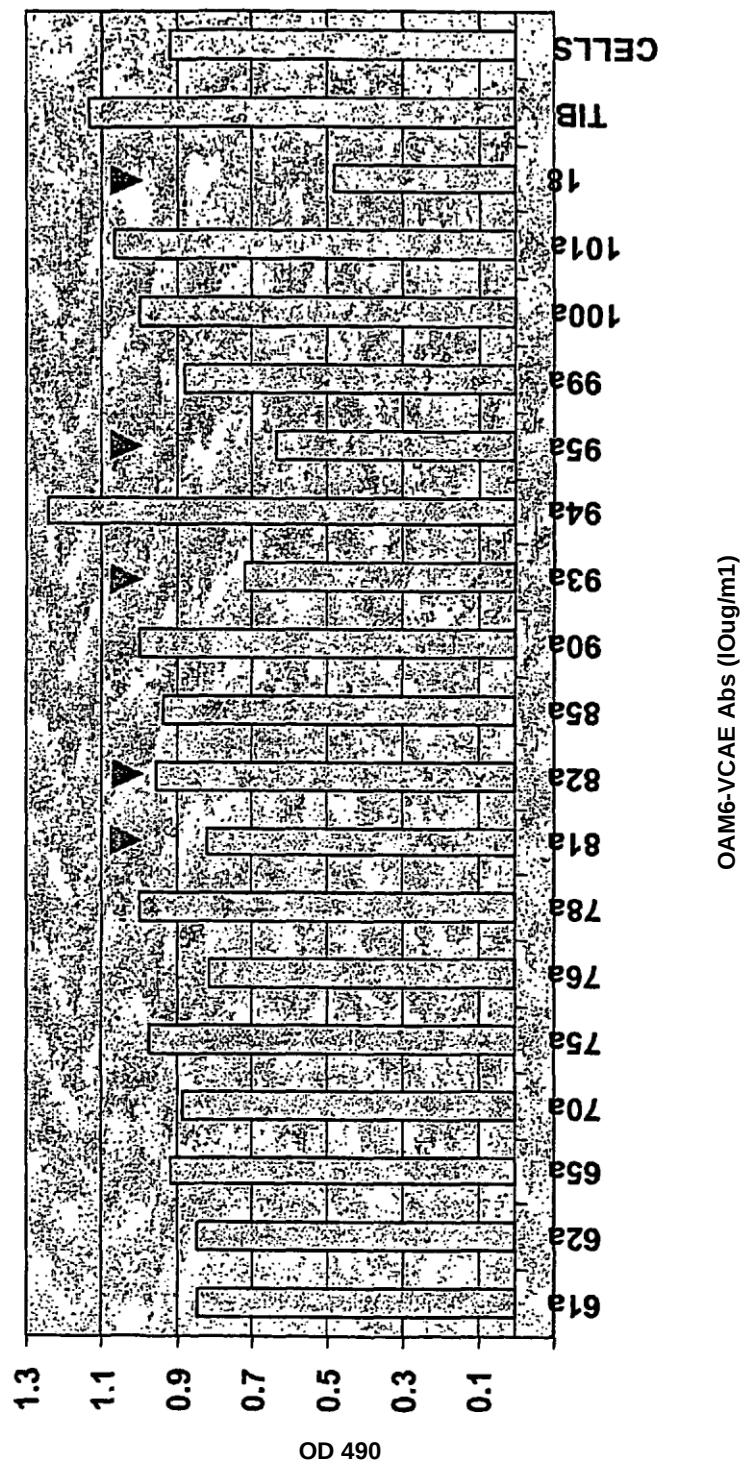


Día de estudio



mAb-VCAE

Ensayo MTT: supervivencia del H460 tras 4 días de tratamiento con ADCs



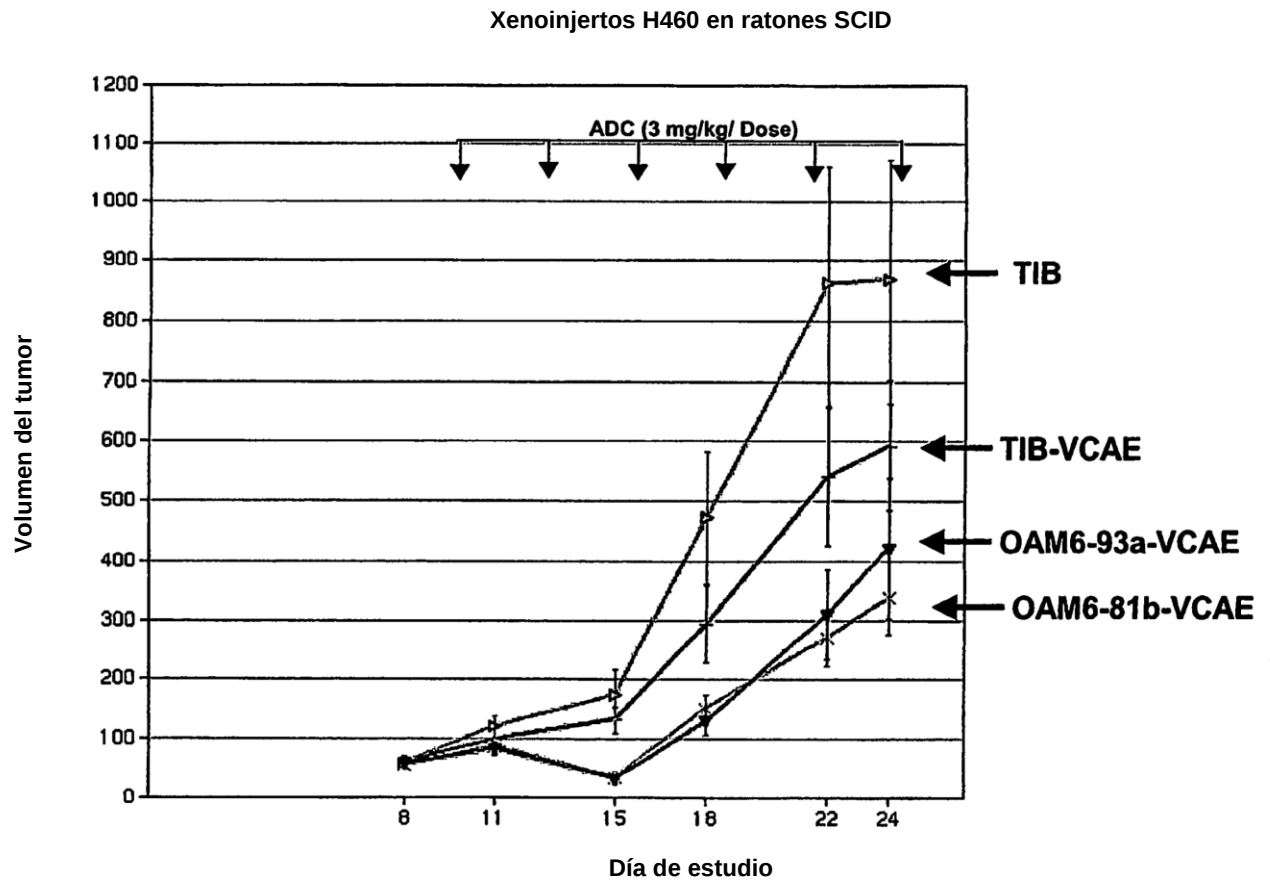


Fig. 10

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citado en la descripción

- US SN10173999 A [0012]
- US 2004005563 A [0012]
- US 5807715 A [0040]
- US 4816567 A [0040] [0041]
- US 4816397 A [0040]
- US 5530101 A, Queen [0041]
- US 5585089 A [0041]
- US 5693761 A [0041]
- US 5693762 A [0041]
- US 6180370 B [0041]
- EP 239400 A [0041]
- WO 9109967 A [0041]
- US 5225539 A [0041]
- EP 592106 A [0041]
- EP 519596 A [0041]
- US 5565332 A [0041]
- US 4444887 A [0042]
- US 4716111 A [0042]
- WO 9846645 A [0042]
- WO 9850433 A [0042]
- WO 9824893 A [0042]
- WO 9816654 A [0042]
- WO 9634096 A [0042]
- WO 9633735 A [0042]
- WO 9110741 A [0042]
- WO 9201047 A [0042]
- EP 0598877 A [0042]
- US 5413923 A [0042]
- US 5625126 A [0042] [0105]
- US 5633425 A [0042] [0105]
- US 5569825 A [0042] [0105]
- US 5661016 A [0042] [0105]
- US 5545806 A [0042] [0105]
- US 5814318 A [0042]
- US 5885793 A [0042]
- US 5916771 A [0042]
- US 5939598 A [0042]
- US 5961955 A [0064]
- US 4675187 A [0067]
- WO 9727212 A [0087]
- WO 9727213 A [0087]
- US 5545807 A [0105]
- US 4946778 A [0106]
- US 5132405 A [0106]
- US 4366241 A [0118]
- US 4376110 A [0118]
- US 4517288 A [0118]
- US 4837168 A [0118]

10 Bibliografía de patentes citada en la descripción

- **PARKER, S. L.** Cancer statistics, 1997, vol. 47, 5-27 [0003]
- **KERLIKOWSKA, K.** Obstet Gynecol, 1992, vol. 80, 700-707 [0004]
- **GRIMES, D. A.** Am J. Obstet. Gynecol., 1992, vol. 166, 1950-1954 [0004]
- **HANKINSON, S. E.** JAMA, 1993, vol. 270, 2813-2818 [0004]
- **FITZGIBBONS et al.** Arch. Pathol. Lab. Med., 2000, vol. 124, 966-978 [0005]
- **HAMILTON ; PICCART.** Ann. Oncol., 2000, vol. 11, 647-663 [0005]
- **ROBSON.** J. Clin. Oncol., 2000, vol. 18, 113-118 [0005]
- **ROSS; FLETCHER.** Stem Cells, 1998, vol. 16, 413-428 [0006]
- **MALONEY et al.** Blood, 1997, vol. 90, 2188-2195 [0006]
- **LEGET ; CZUCZMAN.** Curr. Opin. Oncol., 1998, vol. 10, 548-551 [0006]
- **MCCARTNEY et al.** Protein Eng., 1995, vol. 8, 301 [0031]
- **HUSE et al.** Science, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0032]
- **WARD et al.** Nature, 1989, vol. 341, 544-546 [0032]
- **VAUGHAN et al.** Nature Biotech., 1996, vol. 14, 309-314 [0032]
- **HARLOW ; LANE.** antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 [0038]
- **GILEWSKI et al.** Clin. Cancer Res., 2000, vol. 6, 1693-1701 [0007]
- **SCHOLL et al.** J. Immunother., 2000, vol. 23, 570-580 [0007]
- **BON et al.** Clin. Chem., 1997, vol. 43, 585-593 [0007]
- **OSTERHOFF et al.** DNA AND CELL BIOLOGY, 1997, vol. 16, 379-389 [0011]
- **Pierce Catalog and Handbook.** Pierce Chemical Co, 1994 [0031]
- **KUBY, J.** Immunology. W.H. Freeman & Co, 1998 [0031]
- **KOSTELNY et al.** J Immunol, 1992, vol. 148, 1547 [0031]
- **PACK; PLUCKTHUN.** Biochemistry, 1992, vol. 31, 1579 [0031]
- **GRUBER et al.** J Immunol, 1994, 5368 [0031]
- **ZHU et al.** Protein Sci, 1997, vol. 6, 781 [0031]
- **HU et al.** Cancer Res., 1996, vol. 56, 3055 [0031]
- **ADAMS et al.** Cancer Res., 1993, vol. 53, 4026 [0031]
- **NYGREN.** J. Histochem. and Cytochem., 1982, vol. 30, 407 [0064]
- **HARLOW; LANE.** Antibodies, A Laboratory Manual. 1988 [0076]
- **FIELD et al.** Mol. Cell. Biol, 1988, vol. 8, 2159-2165 [0096]
- **EVAN et al.** Molecular and Cellular Biology, 1985, vol. 5, 3610-3616 [0096]
- **PABORSKY et al.** Protein Engineering, 1990,

- **HAMMERLING et al.** Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas. Elsevier, 1981, 563-681 [0038]
- **MORRISON.** Science, 1985, vol. 229, 1202-1207 [0040]
- **OI et al.** BioTechniques, 1986, vol. 4, 214-221 [0040]
- **GILLIES et al.** J. Immunol. Methods, 1989, vol. 125, 191-202 [0040]
- **PADLAN.** Mol. Immunol., 1991, vol. 28, 489-498 [0041]
- **STUDNICKA et al.** Prot. Eng., 1994, vol. 7, 805-814 [0041]
- **ROGUSKA et al.** Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, vol. 91, 969-973 [0041]
- **LONBERG ; HUSZAR.** Int. Rev. Immunol., 1995, vol. 13, 65-93 [0042]
- **JESPERSEN et al.** Biotechnology, 1988, vol. 12, 899-903 [0043]
- Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology. 1996, vol. 66 [0044]
- **KABAT et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institutes of Health, 1991 [0045]
- **SMITH ; WATERMAN.** Adv. Appl. Math., 1981, vol. 2, 482 [0052]
- **NEEDLEMAN ; WUNSCH.** J. Mol. Biol., 1970, vol. 48, 443 [0052]
- **PEARSON; LIPMAN.** Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1988, vol. 85, 2444 [0052]
- Current Protocols in Molecular Biology. 1995 [0052]
- **ALTSCHUL et al.** Nuc. Acids Res., 1977, vol. 25, 3389-3402 [0053]
- **ALTSCHUL et al.** J. Mol. Biol., 1990, vol. 215, 403-410 [0053]
- **HENIKOFF; HENIKOFF.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, vol. 89, 10915 [0053]
- **KARLIN ; ALTSCHUL.** Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1993, vol. 90, 5873-5787 [0054]
- **CREIGHTON.** Proteins, 1984 [0062]
- **ALBERTS et al.** Molecular Biology of the Cell, 1994 [0063]
- **CANTOR ; SCHIMMEL.** Biophysical Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecules, 1980 [0063]
- **HUNTER et al.** Nature, 1962, vol. 144, 945 [0064]
- **DAVID et al.** Biochemistry, 1974, vol. 13, 1014 [0064]
- **PAIN et al.** J. Immunol. Meth., 1981, vol. 40, 219 [0064]
- **GOODMAN; GILLMAN et al.** The Pharmacological Basis of Therapeutics. 1996 [0134]
- **OSTERHOFF et al.** DNA Cell Biol., 1997, vol. 16, 379-389 [0141]
- **TUKEY J. W.** Exploratory Data Analysis. Addison- Wesley Reading, 1977 [0145]
- **BROCKHOFF et al.** Cytometry, 1994, vol. 17, 75-83 [0167]
- vol. 3 (6), 547-553 [0096]
- **HOPP et al.** BioTechnology, 1988, vol. 6, 1204-1210 [0096]
- **MARTIN et al.** Science, 1992, vol. 255, 192-194 [0096]
- **SKINNER et al.** J. Biol. Chem., 1991, vol. 266, 15163-15166 [0096]
- **LUTZ-FREYERMUTH et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, vol. 87, 6393-6397 [0096]
- **KOHLER; MILSTEIN.** Nature, 1975, vol. 256, 495 [0101]
- **GODING.** Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 1986, 59-103 [0102]
- **HOOGENBOOM ; WINTER.** J. Mol. Biol, 1991, vol. 227, 381 [0105]
- **MARKS et al.** J. Mol. Biol., 1991, vol. 222, 581 [0105]
- **COLE et al.** Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 1985, 77 [0105]
- **BOERNER et al.** J. Immunol., 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0105]
- **MARKS et al.** Bio/Technology, 1992, vol. 10, 779-783 [0105]
- **LONBERG et al.** Nature, 1994, vol. 368, 856-859 [0105]
- **MORRISON.** Nature, 1994, vol. 368, 812-13 [0105]
- **FISHWILD et al.** Nature Biotechnology, 1996, vol. 14, 845-51 [0105]
- **NEUBERGER.** Nature Biotechnology, 1996, vol. 14, 826 [0105]
- **LONBERG; HUSZAR.** Intern. Rev. Immunol., 1995, vol. 13, 65-93 [0105]
- **HUSTON et al.** Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 1988, vol. 8, 5879 [0106]
- **BIRD et al.** Science, 1988, vol. 242, 4236 [0106]
- **GLOCKSHUBER et al.** Biochemistry, 1990, vol. 29, 1362 [0106]
- **STEMMER et al.** Biotechniques, 1993, vol. 14, 256-265 [0106]
- Methods in Cell Biology. Academic Press, Inc, 1993, vol. 37 [0118]
- Basic and Clinical Immunology. 1991 [0118]
- **FIRE, A. et al.** Nature, 1998, vol. 391, 806-811 [0122]
- Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery. **ANSEL et al.** Pharmaceutical Dosage Forms. Dekker, 1992, vol. 1-3 [0128]
- **LLOYD.** The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding, 1999 [0128]
- **PICKAR.** Dosage Calculations, 1999 [0128]
- Remington's Pharmaceutical Science. 1980 [0134]
- **HENSHALL et al.** Oncogene, 2003, vol. 22, 6005-6012 [0175]
- **DORONINA et al.** Nat Biotechnol., 2003, vol. 21, 778-784 [0185]
- **BENSON, DA et al.** Nucleic Acids Research, 1998, vol. 26, 1-7 [0189]