

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 531**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09002989 .3**
96 Fecha de presentación: **11.09.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **2153843**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.02.2010**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para el diagnóstico y tratamiento de tumor**

30 Prioridad:
18.09.2001 US 323268 P
19.10.2001 US 339227 P
07.11.2001 US 336827 P
20.11.2001 US 331906 P
02.01.2002 US 345444 P
03.04.2002 US 369724 P
19.08.2002 US 404809 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.11.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA94080-4990, US

72 Inventor/es:
FRANTZ, GRETCHEN;
HILLAN, KENNETH J.;
PHILLIPS, HEIDI S.;
POLAKIS, PAUL;
SPENCER, SUSAN D.;
WILLIAMS, MICKEY P.;
WU, THOMAS D. y
ZHANG, ZEMIN

74 Agente/Representante:
PONTI SALES, Adelaida

ES 2 390 531 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para el diagnóstico y tratamiento de tumor

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a composiciones de materia útiles para el diagnóstico y el tratamiento de tumor en mamíferos y a procedimientos de uso de aquellas composiciones de materia para los mismos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los tumores malignos (cánceres) son la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos, después de la enfermedad cardíaca (Boring y col., CA Cancel J. Clin. 43:7 (1993)). El cáncer se caracteriza por el aumento en el número de células anormales o neoplásicas derivadas de un tejido normal que proliferan para formar una masa tumoral, la invasión de tejidos adyacentes por estas células tumorales neoplásicas y la generación de células malignas que eventualmente se diseminan por la sangre o el sistema linfático a ganglios linfáticos regionales y a sitios distantes por un proceso llamado metástasis. En un estado canceroso, una célula prolifera en condiciones en las que no crecerían células normales. El cáncer se manifiesta por sí mismo en una amplia variedad de formas, caracterizadas por diferentes grados de invasividad y agresividad.

[0003] En intentos por descubrir dianas celulares eficaces para el diagnóstico y la terapia del cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana o de otro modo asociados a la membrana que se expresan específicamente sobre la superficie de uno o más tipos particulares de célula cancerosa con respecto a sobre una o más células no cancerosas normales. Frecuentemente, tales polipéptidos asociados a membrana se expresan más abundantemente sobre la superficie de las células cancerosas en comparación con sobre la superficie de las células no cancerosas. La identificación de tales polipéptidos de antígeno de superficie celular asociado a tumor ha dado lugar a la capacidad para elegir específicamente como diana células cancerosas para la destrucción por terapias basadas en anticuerpos. A este respecto se observa que la terapia basada en anticuerpos ha demostrado ser muy eficaz en el tratamiento de ciertos cánceres. Por ejemplo, HERCEPTIN® y RITUXAN® (ambos de Genentech Inc., South San Francisco, California) son anticuerpos que se han usado satisfactoriamente para tratar cáncer de mama y linfoma no Hodgkin, respectivamente. Más específicamente, HERCEPTIN® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular del protooncogén del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Se observa la expresión en exceso de la proteína HER2 en el 25-30% de cánceres de mama primarios. RITUXAN® es un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico genéticamente manipulado dirigido contra el antígeno CD20 encontrado sobre la superficie de linfocitos B normales y malignos. Ambos de estos anticuerpos son recombinantemente producidos en células CHO.

[0004] En otros intentos por descubrir dianas celulares eficaces para el diagnóstico y la terapia del cáncer, los investigadores han buscado identificar (1) polipéptidos asociados a no membrana que se producen específicamente por uno o más tipos particulares de célula(s) cancerosa(s) con respecto a por uno o más tipos particulares de célula(s) normal(es) no cancerosa(s), (2) polipéptidos que se producen por células cancerosas a un nivel de expresión que es significativamente superior al de una o más células no cancerosas normales, o (3) polipéptidos cuya expresión está específicamente limitada a sólo un único tipo de tejido (o número muy limitado de diferentes) tipos de tejidos en el estado tanto canceroso como no canceroso (por ejemplo, tejido de próstata normal y de tumor de próstata). Tales polipéptidos pueden permanecer intracelularmente localizados o pueden ser secretados por la célula cancerosa. Además, tales polipéptidos pueden ser expresados no por la propia célula cancerosa, sino más bien por células que producen y/o secretan polipéptidos que tienen un efecto potenciador o que mejora el crecimiento sobre células cancerosas. Tales polipéptidos secretados son frecuentemente proteínas que proveen a las células cancerosas de una ventaja de crecimiento con respecto a células normales e incluyen cosas como, por ejemplo, factores angiogénicos, factores de adhesión celular, factores de crecimiento y similares. Cabría esperar que la identificación de antagonistas de tales polipéptidos asociados a no membrana sirviera de agentes terapéuticos eficaces para el tratamiento de tales cánceres. Además, la identificación del patrón de expresión de tales polipéptidos sería útil para el diagnóstico de cánceres particulares en mamíferos.

[0005] A pesar de los avances anteriormente identificados en la terapia del cáncer de mamífero, hay una gran necesidad de agentes de diagnóstico y terapéuticos adicionales que puedan detectar la presencia de tumor en un mamífero e inhibir eficazmente el crecimiento celular neoplásico, respectivamente. Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención identificar: (1) polipéptidos asociados a la membrana celular que se expresan más abundantemente sobre uno o más tipos de células cancerosas con respecto a sobre células normales o sobre otras células cancerosas diferentes, (2) polipéptidos asociados a no membrana que se producen específicamente por uno o más tipos particulares de células cancerosas (o por otras células que hace que los polipéptidos tengan un efecto

potenciador sobre el crecimiento de células cancerosas) con respecto a por uno o más tipos particulares de células normales no cancerosas, (3) polipéptidos asociados a no membrana que son producidos por células cancerosas a un nivel de expresión que es significativamente superior al de una o más células normales no cancerosas, o (4) polipéptidos cuya expresión está específicamente limitada a sólo un único tipo de tejido (o número muy limitado de diferentes) tipos de tejidos en el estado tanto canceroso como no canceroso (por ejemplo, tejido de próstata normal y de tumor de próstata), y usar aquellos polipéptidos, y sus ácidos nucleicos codificantes, para producir composiciones de materia útiles en el tratamiento terapéutico y la detección diagnóstica de cáncer en mamíferos. También es un objetivo de la presente invención identificar polipéptidos asociados a la membrana celular, secretados o intracelulares cuya expresión está limitada a un único tejido o número muy limitado de tejidos, y usar aquellos polipéptidos, y sus ácidos nucleicos codificantes, para producir composiciones de materia útiles en el tratamiento terapéutico y la detección diagnóstica de cáncer en mamíferos.

RESUMEN DE LA INVENCION

15 A. Realizaciones

[0006] En la presente memoria descriptiva los solicitantes describen la identificación de diversos polipéptidos celulares (y sus ácidos nucleicos codificantes o fragmentos de los mismos) que se expresan a un mayor grado sobre la superficie de o por uno o más tipos de células cancerosas con respecto a sobre la superficie de o por uno o más tipos de células no cancerosas normales. Alternativamente, tales polipéptidos son expresados por células que producen y/o secretan polipéptidos que tienen un efecto potenciador o de mejora del crecimiento sobre células cancerosas. De nuevo alternativamente, puede que tales polipéptidos no sean expresados en exceso por células tumorales con respecto a células normales del mismo tipo de tejido, sino que puedan ser específicamente expresados por tanto células tumorales como células normales de sólo un único tejido o número de tipos de tejido muy limitado (preferentemente tejidos que no son esenciales para la vida, por ejemplo, próstata, etc.). Todos los polipéptidos anteriores se denominan en el presente documento polipéptidos diana antigénica asociada a tumor ("Tumor-associated Antigenic Target) (polipéptidos "TAT") y se espera que sirvan de dianas eficaces para terapia del cáncer y diagnóstico en mamíferos.

[0007] En el presente documento se desvela una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido diana antigénica asociada a tumor o fragmento del mismo (un polipéptido "TAT").

[0008] En ciertos aspectos, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias de ácidos nucleicos, alternativamente al menos aproximadamente el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias de ácidos nucleicos, con (a) una molécula de ADN que codifica un polipéptido TAT de longitud completa que tiene una secuencia de aminoácidos como se desvela en el presente documento, una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT que carece del péptido señal como se desvela en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido señal, como se desvela en el presente documento, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT de longitud completa como se desvela en el presente documento, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

[0009] En otros aspectos, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias de ácidos nucleicos, alternativamente al menos aproximadamente el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias de ácidos nucleicos, con (a) una molécula de ADN que comprende la secuencia codificante de un ADNc de polipéptido TAT de longitud completa como se desvela en el presente documento, la secuencia codificante de un polipéptido TAT que carece del péptido señal como se desvela en el presente documento, la secuencia codificante de un dominio extracelular de un polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido señal, como se desvela en el presente documento, o la secuencia codificante de cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT de longitud completa como se desvela en el presente documento, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

[0010] En otros aspectos, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias de ácidos nucleicos, alternativamente al menos aproximadamente el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias de ácidos nucleicos, con (a) una molécula de ADN que codifica el mismo polipéptido maduro codificado por la región codificante de longitud completa de cualquiera de los ADNc de proteína humana depositados en la ATCC como se desvela en el presente documento, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

[0011] También se desvela una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido TAT que está tanto deletada del dominio transmembrana como inactivada del dominio transmembrana, o es complementaria a una secuencia de nucleótidos codificante tal, en la que el (los) dominio(s) transmembrana de tal(es) polipéptido(s) se desvela(n) en el presente documento. Por tanto, se contemplan dominios extracelulares solubles de los polipéptidos TAT descritos en el presente documento.

[0012] También se desvelan moléculas de ácidos nucleicos aisladas que se hibridan con (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido TAT que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se desvela en el presente documento, una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT que carece del péptido señal como se desvela en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido señal, como se desvela en el presente documento, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT de longitud completa como se desvela en el presente documento, o (b) el complemento de la secuencia de nucleótidos de (a). A este respecto, una realización de la presente invención se refiere a fragmentos de una secuencia codificante del polipéptido TAT de longitud completa, o el complemento de la misma, como se desvela en el presente documento, que puede usarse como, por ejemplo, sondas de hibridación útiles como, por ejemplo, sondas de diagnóstico, sondas de oligonucleótidos antisentido o fragmentos codificantes de un polipéptido TAT de longitud completa que pueden codificar opcionalmente un polipéptido que comprende un sitio de unión para un anticuerpo anti-polipéptido TAT, un oligopéptido de unión a TAT u otra molécula orgánica pequeña que se une a un polipéptido TAT. Tales fragmentos de ácido nucleico tienen normalmente al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 340, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 ó 1000 nucleótidos de longitud, en las que en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de secuencia de nucleótidos mencionada más o menos el 10% de esa longitud mencionada. Se observa que fragmentos novedosos de una secuencia de nucleótidos codificante del polipéptido TAT pueden determinarse de un modo rutinario alineando la secuencia de nucleótidos codificante del polipéptido TAT con otras secuencias de nucleótidos conocidas usando distintos programas de alineamiento de secuencias muy conocidos y determinando qué fragmento(s) de la secuencia de nucleótidos codificante del polipéptido TAT son novedosos. Todos de tales fragmentos novedosos de las secuencias de nucleótidos codificantes del polipéptido TAT se contemplan en el presente documento. También se contemplan los fragmentos del polipéptido TAT codificados por estos fragmentos de moléculas de nucleótidos, preferentemente aquellos fragmentos del polipéptido TAT que comprenden un sitio de unión para un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido de unión a TAT u otra molécula orgánica pequeña que se une a un polipéptido TAT.

[0013] En el presente documento también se desvelan polipéptidos TAT aislados codificados por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos aisladas anteriormente identificadas en el presente documento, y un polipéptido TAT aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias de aminoácidos, con un polipéptido TAT que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se desvela en el presente documento, una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT que carece del péptido señal como se desvela en el presente documento, un dominio extracelular de una proteína del polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido señal, como se desvela en el presente documento, una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos desveladas en el presente documento, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT de longitud completa como se desvela en el presente documento.

[0014] También se desvela un polipéptido TAT aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencias de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de los ADNc de proteína humana depositados en la ATCC como se desvela en el presente documento.

[0015] Adicionalmente se desvela un polipéptido TAT aislado sin la secuencia señal del extremo N y/o sin la metionina de iniciación y está codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Los procedimientos para producir el mismo también se describen en el presente documento, en los que aquellos procedimientos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada

en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido TAT y recuperar el polipéptido TAT del cultivo celular.

[0016] También se desvela un polipéptido TAT aislado que está tanto delecionado en el dominio transmembrana como inactivado en el dominio transmembrana. Los procedimientos para producir el mismo también se describen en el presente documento, en los que aquellos procedimientos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido TAT y recuperar el polipéptido TAT del cultivo celular.

[0017] También se desvelan vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento. También se proporcionan células huésped que comprenden cualquiera de tal vector. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células de *E. coli* o células de levadura. Adicionalmente se proporciona un procedimiento para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento y comprende cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

[0018] Adicionalmente se desvelan polipéptidos quiméricos aislados que comprenden cualquiera de los polipéptidos TAT descritos en el presente documento fusionado con un polipéptido heterólogo (no TAT). Ejemplos de tales moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los polipéptidos TAT descritos en el presente documento fusionado con un polipéptido heterólogo tal como, por ejemplo, una secuencia de marca de epítipo o una región Fc de una inmunoglobulina.

[0019] En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une, preferentemente específicamente, a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o más adelante para su uso como se describe en las reivindicaciones. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo monocatenario o anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo anti-polipéptido TAT a su epítipo antigénico respectivo. Los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico tal como una toxina, que incluye, por ejemplo, un maitansinoide o caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o células bacterianas, y preferentemente inducen la muerte de una célula con la que se unen. Para fines de diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención pueden marcarse detectablemente, unirse a un soporte sólido, similares.

[0020] En el presente documento se desvelan vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. También se proporcionan células huésped que comprenden cualquiera de tal vector. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células de *E. coli* o células de levadura. Adicionalmente se proporciona un procedimiento para producir cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento y comprende cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo deseado y recuperar el anticuerpo deseado del cultivo celular.

[0021] En una realización adicional, la invención se refiere a una composición de materia que comprende un anticuerpo anti-TAT como se describe en el presente documento en combinación con un vehículo. Opcionalmente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0022] En otra realización más, la invención se refiere a un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición de materia contenida dentro del recipiente, en el que la composición de materia puede comprender un anticuerpo anti-TAT como se describe en el presente documento. El artículo puede comprender adicionalmente opcionalmente una etiqueta fijada al recipiente, o un prospecto incluido con el recipiente, que se refiere al uso de la composición de materia para el tratamiento terapéutico o la detección de diagnóstico de un tumor.

[0023] Otra realización de la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo anti-polipéptido TAT como se describe en el presente documento para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una afección que es sensible al polipéptido TAT, polipéptido TAT quimérico, anticuerpo anti-polipéptido TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT.

B. Realizaciones adicionales

[0024] Otra realización de la presente invención se refiere a un procedimiento para inhibir el crecimiento de una célula que expresa un polipéptido TAT, en el que el procedimiento comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo que se une al polipéptido TAT, y en el que la unión del anticuerpo al polipéptido TAT produce la inhibición del crecimiento de la célula que expresa el polipéptido TAT. La célula es una célula de cáncer de colon y la unión del anticuerpo al polipéptido TAT produce preferentemente la muerte de la célula que expresa el polipéptido

TAT. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo monocatenario. Los anticuerpos empleados en los procedimientos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico tal como una toxina que incluye, por ejemplo, un maitansinoide o caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Los anticuerpos en los procedimientos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o células bacterianas.

[0025] Todavía otra realización de la presente invención se refiere a un procedimiento de tratar terapéuticamente un mamífero que tiene un tumor de colon canceroso que comprende células que expresan un polipéptido TAT, en el que el procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une al polipéptido TAT, produciéndose así el tratamiento terapéutico eficaz del tumor. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo monocatenario. Anticuerpos empleados en los procedimientos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico tal como una toxina que incluye, por ejemplo, un maitansinoide o caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Los anticuerpos empleados en los procedimientos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o células bacterianas.

[0026] En el presente documento también se desvela un procedimiento de determinación de la presencia de un polipéptido TAT en una muestra que se sospecha que contiene el polipéptido TAT, en el que el procedimiento comprende exponer la muestra a un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica pequeña que se une al polipéptido TAT y determinar la unión del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica al polipéptido TAT en la muestra, en el que la presencia de tal unión es indicativa de la presencia del polipéptido TAT en la muestra. Opcionalmente, la muestra puede contener células (que pueden ser células cancerosas) que se sospecha que expresan el polipéptido TAT. El anticuerpo, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT empleados en el procedimiento pueden marcarse opcionalmente detectablemente, unirse a un soporte sólido, o similares.

[0027] Otra realización de la presente invención se refiere a un procedimiento de diagnosticar la presencia de un tumor de colon en un mamífero, en el que el procedimiento comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido TAT (a) en una muestra de prueba de células de tejido obtenidas de dicho mamífero, y (b) en una muestra de control de células no cancerosas normales conocidas del mismo origen o tipo de tejido, en el que un mayor nivel de expresión del polipéptido TAT en la muestra de prueba, con respecto a la muestra de control, es indicativo de la presencia de tumor en el mamífero del que se obtuvo la muestra de prueba.

[0028] Otra realización de la presente invención se refiere a un procedimiento de diagnosticar la presencia de un tumor de colon en un mamífero, en el que el procedimiento comprende (a) poner en contacto una muestra de prueba que comprende células de tejido obtenidas del mamífero con un anticuerpo que se une a un polipéptido TAT y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y el polipéptido TAT en la muestra de prueba, en el que la formación de un complejo es indicativa de la presencia de un tumor en el mamífero. Opcionalmente, el anticuerpo empleado está marcado detectablemente, se une a un soporte sólido, o similares, y/o la muestra de prueba de células de tejido se obtiene a partir de un individuo del que se sospecha que tiene un tumor canceroso.

[0029] Otra realización más de la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno proliferativo de células de colon asociado a expresión o actividad alterada, preferentemente elevada, de un polipéptido TAT, procedimiento que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-polipéptido TAT. El tratamiento o la prevención eficaz del trastorno proliferativo de células puede ser un resultado de la destrucción directa o inhibición del crecimiento de células que expresan un polipéptido TAT o antagonizando la actividad potenciadora del crecimiento celular de un polipéptido TAT.

[0030] En el presente documento también se desvela un procedimiento de unir un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica pequeña a una célula que expresa un polipéptido TAT, en el que el procedimiento comprende poner en contacto una célula que expresa un polipéptido TAT con dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica pequeña en condiciones que son adecuadas para unir el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica pequeña a dicho polipéptido TAT y permitir la unión entre ellos.

[0031] Otras realizaciones de la presente invención se refieren al uso de un anticuerpo anti-polipéptido TAT en la preparación de un medicamento útil para (i) el tratamiento terapéutico o la detección de diagnóstico de un cáncer o tumor de colon, o (ii) el tratamiento terapéutico o la prevención de un trastorno proliferativo de células de colon.

[0032] Otra realización de la presente invención se refiere a un procedimiento para inhibir el crecimiento de una célula de cáncer de colon, en el que el crecimiento de dicha célula cancerosa es al menos en parte dependiente del (de los) efecto(s) potenciador(es) del crecimiento de un polipéptido TAT (en el que el polipéptido TAT puede ser

expresado tanto por la propia célula cancerosa como por una célula que produce polipéptido(s) que tiene un efecto potenciador del crecimiento sobre células cancerosas), en el que el procedimiento comprende poner en contacto el polipéptido TAT con un anticuerpo que se une al polipéptido TAT, antagonizando así la actividad potenciadora del crecimiento del polipéptido TAT y, a su vez, inhibiendo el crecimiento de la célula cancerosa. Preferentemente, el crecimiento de la célula cancerosa se inhibe completamente. Incluso más preferentemente, la unión del anticuerpo al polipéptido TAT induce la muerte de la célula cancerosa. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo monocatenario. Los anticuerpos empleados en los procedimientos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico tal como una toxina que incluye, por ejemplos, un maitansinoide o caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Los anticuerpos empleados en los procedimientos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o células bacterianas.

[0033] Otra realización más de la presente invención se refiere a un procedimiento de tratar terapéuticamente un tumor de colon en un mamífero, en el que el crecimiento de dicho tumor es al menos en parte dependiente del (de los) efecto(s) potenciador(es) del crecimiento de un polipéptido TAT, en el que el procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une al polipéptido TAT, antagonizando así la actividad potenciadora del crecimiento de dicho polipéptido TAT y produciendo el tratamiento terapéutico eficaz del tumor. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo monocatenario. Los anticuerpos empleados en los procedimientos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico tal como una toxina que incluye, por ejemplo, un maitansinoide o caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Los anticuerpos y oligopéptidos empleados en los procedimientos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o células bacterianas.

[0034] En el presente documento se desvela el siguiente conjunto de posibles reivindicaciones para la presente solicitud:

1. Ácido nucleico aislado que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias de ácidos nucleicos con:

(a) una molécula de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);

(b) una molécula de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;

(c) una molécula de ADN que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;

(d) una molécula de ADN que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;

(e) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36);

(f) la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o

(g) el complemento de (a), (b), (c), (d), (e) o (f).

2. Ácido nucleico aislado que tiene:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);

(b) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;

(d) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;

- (e) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36);
- 5 (f) la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- (g) el complemento de (a), (b), (c), (d), (e) o (f).
3. Ácido nucleico aislado que se hibrida con:
- 10 (a) un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- (b) un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- 15 (c) un ácido nucleico que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;
- (d) un ácido nucleico que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- 20 (e) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36);
- (f) la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- 25 (g) el complemento de (a), (b), (c), (d), (e) o (f).
4. El ácido nucleico de la reivindicación 3, en el que la hibridación se produce bajo condiciones rigurosas.
- 30 5. El ácido nucleico de la reivindicación 3 que tiene al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud.
6. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1, 2 ó 3.
- 35 7. El vector de expresión de la reivindicación 6, en el que dicho ácido nucleico está operativamente ligado a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector.
8. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 7.
- 40 9. La célula huésped de la reivindicación 8 que es una célula CHO, una célula de *E. coli* o una célula de levadura.
10. Un procedimiento para producir un polipéptido que comprende la célula huésped de la reivindicación 8 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido y recuperar dicho polipéptido del cultivo celular.
- 45 11. Un polipéptido aislado que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos con:
- (a) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- 50 (b) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;
- (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- 55 (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36).
- 60 12. Un polipéptido aislado que tiene:

- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92),
- (b) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- 5 (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su secuencia de péptido señal asociado;
- (d) una secuencia de aminoácidos o un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- 10 (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36), o
- 15 (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36).
13. Un polipéptido quimérico que comprende el polipéptido de la reivindicación 11 ó 12 fusionado con un polipéptido heterólogo.
- 20 14. El polipéptido quimérico de la reivindicación 13, en el que dicho polipéptido heterólogo es una secuencia de marca de epítipo o una región Fc de una inmunoglobulina.
15. Un anticuerpo aislado que se une a un polipéptido que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos con:
- 25 (a) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- (b) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- 30 (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;
- (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- 35 (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36).
- 40 16. Un anticuerpo aislado que se une a un polipéptido que tiene:
- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- 45 (b) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su secuencia de péptido señal asociado;
- 50 (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- 55 (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36).
- 60 17. El anticuerpo de la reivindicación 15 ó 16 que es un anticuerpo monoclonal.
18. El anticuerpo de la reivindicación 13 ó 16 que es un fragmento de anticuerpo.

19. El anticuerpo de la reivindicación 15 ó 16 que es un anticuerpo quimérico o humanizado.
- 5 20. El anticuerpo de la reivindicación 15 ó 16 que está conjugado con un agente inhibidor del crecimiento.
21. El anticuerpo de la reivindicación 15 ó 16 que está conjugado con un agente citotóxico.
22. El anticuerpo de la reivindicación 21, en el que el agente citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en
10 toxinas, antibióticos, isótopos radiactivos y enzimas nucleolíticas.
23. El anticuerpo de la reivindicación 21, en el que el agente citotóxico es una toxina.
24. El anticuerpo de la reivindicación 23, en el que la toxina está seleccionada del grupo que consiste en
15 maitansinoide y caliqueamicina.
25. El anticuerpo de la reivindicación 23, en el que la toxina es un maitansinoide.
26. El anticuerpo de la reivindicación 15 ó 16 que se produce en bacterias.
- 20 27. El anticuerpo de la reivindicación 15 ó 16 que se produce en células CHO.
28. El anticuerpo de la reivindicación 15 ó 16 que induce muerte de una célula con la que se une.
29. El anticuerpo de la reivindicación 15 ó 16 que está marcado detectablemente.
- 25 30. Un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de la reivindicación 15 ó 16.
31. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 30 operativamente ligado a
30 secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector.
32. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 31.
33. La célula huésped de la reivindicación 32 que es una célula CHO, una célula de *E. coli* o una célula de levadura.
- 35 34. Un procedimiento para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 32 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho anticuerpo y recuperar dicho anticuerpo del cultivo celular.
35. Un oligopéptido aislado que se une a un polipéptido que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias de
40 aminoácidos con:
- (a) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- 45 (b) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;
- (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal
50 asociado;
- (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada
55 en la Figura 1 (SEQ ID NO 36).
36. Un oligopéptido aislado que se une a un polipéptido que tiene:
- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- 60 (b) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;

- (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su secuencia de péptido señal asociado;
- 5 (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- 10 (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO. 36).
37. El oligopéptido de la reivindicación 35 ó 36 que está conjugado con un agente inhibidor del crecimiento.
- 15 38. El oligopéptido de la reivindicación 35 ó 36 que está conjugado con un agente citotóxico.
39. El oligopéptido de la reivindicación 38, en el que el agente citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radiactivos y enzimas nucleolíticas.
- 20 40. El oligopéptido de la reivindicación 38, en el que el agente citotóxico es una toxina.
41. El oligopéptido de la reivindicación 40, en el que la toxina está seleccionada del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.
- 25 42. El oligopéptido de la reivindicación 40, en el que la toxina es un maitansinoide.
43. El oligopéptido de la reivindicación 35 ó 36 que induce muerte de una célula con la que se une.
- 30 44. El oligopéptido de la reivindicación 35 ó 36 que está marcado detectablemente.
45. Una molécula orgánica de unión a TAT que se une a un polipéptido que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos con:
- 35 (a) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- (b) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;
- 40 (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- 45 (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36).
46. La molécula orgánica de la reivindicación 45 que se une a un polipéptido que tiene:
- 50 (a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- (b) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- 55 (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su secuencia de péptido señal asociado;
- (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- 60 (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36).

47. La molécula orgánica de la reivindicación 45 ó 46 que está conjugada con un agente inhibidor del crecimiento.

48. La molécula orgánica de la reivindicación 45 ó 46 que está conjugada con un agente citotóxico.

49. La molécula orgánica de la reivindicación 48, en la que el agente citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radiactivos y enzimas nucleolíticas.

50. La molécula orgánica de la reivindicación 48, en la que el agente citotóxico es una toxina.

51. La molécula orgánica de la reivindicación 50, en la que la toxina está seleccionada del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.

52. La molécula orgánica de la reivindicación 50, en la que la toxina es un maitansinoide.

53. La molécula orgánica de la reivindicación 45 ó 46 que induce muerte de una célula con la que se une.

54. La molécula orgánica de la reivindicación 45 ó 46 que está marcada detectablemente.

55. Una composición de materia que comprende:

(a) el polipéptido de la reivindicación 11;

(b) el polipéptido de la reivindicación 12;

(c) el polipéptido quimérico de la reivindicación 13;

(d) el anticuerpo de la reivindicación 15;

(e) el anticuerpo de la reivindicación 16;

(f) el oligopéptido de la reivindicación 35;

(g) el oligopéptido de la reivindicación 36;

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

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

56. La composición de materia de la reivindicación 55, en la que dicho vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

57. Un artículo de fabricación que comprende;

(a) un recipiente, y

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

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

59. Un procedimiento para inhibir el crecimiento de una célula que expresa una proteína que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos con:

(a) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);

(b) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;

5 (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o

(f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36), comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica que se une a dicha proteína, produciendo así la unión de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína una inhibición del crecimiento de dicha célula.

60. El procedimiento de la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

15 61. El procedimiento de la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

62. El procedimiento de la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

20 63. El procedimiento de la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica está conjugado con un agente inhibidor del crecimiento.

64. El procedimiento de la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica está conjugado con un agente citotóxico.

25 65. El procedimiento de la reivindicación 64, en el que dicho agente citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radiactivos y enzimas nucleolíticas.

66. El procedimiento de la reivindicación 64, en el que el agente citotóxico es una toxina.

30 67. El procedimiento de la reivindicación 66, en el que la toxina está seleccionada del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.

68. El procedimiento de la reivindicación 66, en el que la toxina es un maitansinoide.

35 69. El procedimiento de la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo se produce en bacterias.

70. El procedimiento de la reivindicación 59, en el que dicho anticuerpo se produce en células CHO

71. El procedimiento de la reivindicación 59, en el que dicha célula es una célula cancerosa.

40 72. El procedimiento de la reivindicación 71, en el que dicha célula cancerosa está adicionalmente expuesta a tratamiento de radiación o un agente quimioterapéutico.

45 73. El procedimiento de la reivindicación 71, en el que dicha célula cancerosa está seleccionada del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de ovario, un célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de cáncer de hígado, un célula de cáncer de vejiga, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de melanoma y una célula de leucemia.

50 74. El procedimiento de la reivindicación 71, en el que dicha proteína está expresada más abundantemente por dicha célula cancerosa con respecto a una célula normal del mismo origen de tejido.

75. El procedimiento de la reivindicación 59 que produce la muerte de dicha célula.

55 76. El procedimiento de la reivindicación 59, en el que dicha proteína tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);

(b) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;

60 (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO. 92), con su secuencia de péptido señal asociado;

- (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- 5 (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36).
- 10 77. Un procedimiento de tratar terapéuticamente un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende células que expresan una proteína que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos con:
- 15 (a) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- (b) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;
- 20 (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- 25 (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36), comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica que se une a dicha proteína, tratando así eficazmente dicho mamífero.
- 30 78. El procedimiento de la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
79. El procedimiento de la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
80. El procedimiento de la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.
- 35 81. El procedimiento de la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica está conjugado con un agente inhibidor del crecimiento.
82. El procedimiento de la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica está conjugado con un agente citotóxico.
- 40 83. El procedimiento de la reivindicación 82, en el que dicho agente citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radiactivos y enzimas nucleolíticas.
84. El procedimiento de la reivindicación 82, en el que el agente citotóxico es una toxina.
- 45 85. El procedimiento de la reivindicación 84, en el que la toxina está seleccionada del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.
86. El procedimiento de la reivindicación 84, en el que la toxina es un maitansinoide.
- 50 87. El procedimiento de la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo se produce en bacterias.
88. El procedimiento de la reivindicación 77, en el que dicho anticuerpo se produce en células CHO.
- 55 89. El procedimiento de la reivindicación 77, en el que dicho tumor está expuesto adicionalmente a tratamiento de radiación o un agente quimioterapéutico.
90. El procedimiento de la reivindicación 77, en el que dicho tumor es un tumor de mama, un tumor colorrectal, un tumor de pulmón, un tumor de ovario, un tumor del sistema nervioso central, un tumor de hígado, un tumor de vejiga, un tumor pancreático o un tumor del cuello uterino.
- 60 91. El procedimiento de la reivindicación 77, en el que dicha proteína está expresada más abundantemente por las

células cancerosas de dicho tumor con respecto a una célula normal del mismo origen de tejido.

92. El procedimiento de la reivindicación 77, en el que dicha proteína tiene:

- 5 (a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- (b) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- 10 (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su secuencia de péptido señal asociado;
- (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- 15 (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36).

93. Un procedimiento de determinación de la presencia de una proteína en una muestra que se sospecha que contiene dicha proteína, en el que dicha proteína tiene al menos el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos con:

- 25 (a) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- (b) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;
- 30 (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 ó 119 (SEQ ID NO 36); o
- 35 (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36), comprendiendo dicho procedimiento exponer dicha muestra a un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica que se une a dicha proteína y determinar la unión de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína en dicha muestra, en el que la unión del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína es indicativa de la presencia de dicha proteína en dicha muestra.

94. El procedimiento de la reivindicación 93, en el que dicha muestra comprende una célula que se sospecha que expresa dicha proteína.

45 95. El procedimiento de la reivindicación 94, en el que dicha célula es una célula cancerosa.

96. El procedimiento de la reivindicación 93, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica está marcado detectablemente.

50 97. El procedimiento de la reivindicación 93, en el que dicha proteína tiene:

- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- (b) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- 55 (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su secuencia de péptido señal asociado;
- (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado; (c) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o

5 (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36).

98. Un procedimiento de diagnosticar la presencia de un tumor en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento determinar el nivel de expresión de un gen que codifica una proteína que tiene al menos el 80% de identidad de
10 secuencias de aminoácidos con:

(a) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);

15 (b) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal
20 asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o

(f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada
25 en la Figura 1 (SEQ ID NO 36), en una muestra de prueba de células de tejido obtenidas de dicho mamífero y en una muestra de control de células normales conocidas del mismo origen de tejido, en el que un mayor nivel de expresión de dicha proteína en la muestra de prueba, con respecto a la muestra de control, es indicativa de la presencia de tumor en el mamífero del que se obtuvo la muestra de prueba.

99. El procedimiento de la reivindicación 98, en el que la etapa de determinar el nivel de expresión de un gen que
30 codifica dicha proteína comprende emplear un oligonucleótido en una hibridación *in situ* o análisis por RT-PCR.

100. El procedimiento de la reivindicación 98, en el que la etapa de determinar el nivel de expresión de un gen que
35 codifica dicha proteína comprende emplear un anticuerpo en un análisis de inmunohistoquímica o de transferencia Western.

101. El procedimiento de la reivindicación 98, en el que dicha proteína tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);

40 (b) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO
45 92), con su secuencia de péptido señal asociado;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO
92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO
50 36); o (SEQ ID NO 36); o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de
nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36).

102. Un procedimiento de diagnosticar la presencia de un tumor en un mamífero, comprendiendo dicho
55 procedimiento poner en contacto una muestra de prueba de células de tejido obtenidas de dicho mamífero con un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica que se une a una proteína que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos con:

60 (a) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);

(b) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;

- (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;
- 5 (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 36); o
- 10 (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36), y detectar formación de un complejo entre dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica y dicha proteína en la muestra de prueba, en el que la formación de un complejo es indicativa de la presencia de un tumor en dicho mamífero.
- 15 103. El procedimiento de la reivindicación 102, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica está marcado detectablemente.
104. El procedimiento de la reivindicación 102, en el que dicha muestra de prueba de células de tejido se obtiene a partir de un individuo del que se sospecha que tiene un tumor canceroso.
- 20 105. El procedimiento de la reivindicación 102, en el que dicha proteína tiene:
- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- 25 (b) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su secuencia de péptido señal asociado;
- 30 (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- 35 (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 7 (SEQ ID NO 36).
- 40 106. Un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno proliferativo de células asociado a expresión o actividad elevada de una proteína que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos con:
- (a) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- 45 (b) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado; mostrado en la Figura 2
- (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;
- (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- 50 (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36), comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de un antagonista de dicha proteína, tratando o previniendo así eficazmente dicho trastorno proliferativo de células.
- 55 107. El procedimiento de la reivindicación 106, en el que dicho trastorno proliferativo de células es cáncer.
- 60 108. El procedimiento de la reivindicación 106, en el que dicho antagonista es un anticuerpo anti-polipéptido TAT, oligopéptido de unión a TAT, molécula orgánica de unión a TAT u oligonucleótido antisentido.

109. Un procedimiento de unión de un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a una célula que expresa una proteína que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos con:

- 5 (a) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- (b) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- 10 (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;
- (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- 15 (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36), comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica que se une a dicha proteína y permitir que se produzca la unión del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína, uniéndose así dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha célula.
- 20
110. El procedimiento de la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
111. El procedimiento de la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
- 25 112. El procedimiento de la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.
113. El procedimiento de la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica está conjugado con un agente inhibidor del crecimiento.
- 30 114. El procedimiento de la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica está conjugado con un agente citotóxico.
115. El procedimiento de la reivindicación 114, en el que dicho agente citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radiactivos y enzimas nucleolíticas.
- 35 116. El procedimiento de la reivindicación 114, en el que el agente citotóxico es una toxina.
117. El procedimiento de la reivindicación 116, en el que la toxina está seleccionada del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.
- 40 118. El procedimiento de la reivindicación 116, en el que la toxina es un maitansinoide.
119. El procedimiento de la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo se produce en bacterias.
- 45 120. El procedimiento de la reivindicación 109, en el que dicho anticuerpo se produce en células CHO.
121. El procedimiento de la reivindicación 109, en el que dicha célula es una célula cancerosa.
- 50 122. El procedimiento de la reivindicación 121, en el que dicha célula cancerosa está expuesta adicionalmente a tratamiento de radiación o un agente quimioterapéutico.
123. El procedimiento de la reivindicación 121, en el que dicha célula cancerosa está seleccionada del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de ovario, un célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de cáncer de hígado, un célula de cáncer de vejiga, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de melanoma y una célula de leucemia.
- 55 124. El procedimiento de la reivindicación 123, en el que dicha proteína está expresada más abundantemente por dicha célula cancerosa con respecto a una célula normal del mismo origen de tejido.
- 60 125. El procedimiento de la reivindicación 109 que produce la muerte de dicha célula.

126. Uso de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 30 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección de diagnóstico de un cáncer.
- 5 127. Uso de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 30 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
128. Uso de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 30 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de células.
- 10 129. Uso de un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 ó 31 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección de diagnóstico de un cáncer.
- 15 130. Uso de un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 ó 31 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
131. Uso de un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 ó 31 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de células.
- 20 132. Uso de una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 8, 9, 32 ó 33 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección de diagnóstico de un cáncer.
133. Uso de una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 8, 9, 32 ó 33 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
- 25 134. Uso de una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 8, 9, 32 ó 33 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de células.
135. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección de diagnóstico de un cáncer.
- 30 136. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
- 35 137. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de células.
138. Uso de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 29 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección de diagnóstico de un cáncer.
- 40 139. Uso de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 29 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
140. Uso de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 29 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de células.
- 45 141. Uso de un oligopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 44 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección de diagnóstico de un cáncer.
- 50 142. Uso de un oligopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 44 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
143. Uso de un oligopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 44 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de células.
- 55 144. Uso de una molécula orgánica de unión a TAT según cualquiera de las reivindicaciones 45 a 54 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección de diagnóstico de un cáncer.
145. Uso de una molécula orgánica de unión a TAT según cualquiera de las reivindicaciones 45 a 54 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.
- 60 146. Uso de una molécula orgánica de unión a TAT según cualquiera de las reivindicaciones 45 a 54 en la

preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de células.

147. Uso de una composición de materia según cualquiera de las reivindicaciones 55 ó 56 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección de diagnóstico de un cáncer.

148. Uso de una composición de materia según cualquiera de las reivindicaciones 55 ó 56 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.

149. Uso de una composición de materia según cualquiera de las reivindicaciones 55 ó 56 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de células.

150. Uso de un artículo de fabricación según cualquiera de las reivindicaciones 57 ó 58 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección de diagnóstico de un cáncer.

151. Uso de un artículo de fabricación según cualquiera de las reivindicaciones 57 ó 58 en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.

152. Uso de un artículo de fabricación según cualquiera de las reivindicaciones 57 ó 58 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de células.

153. Un procedimiento para inhibir el crecimiento de una célula, en el que el crecimiento de dicha célula es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de una proteína que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos con:

(a) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);

(b) el polipéptido mostrado en la Figura (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con sus péptidos señal asociados;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o

(f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36), comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha proteína con un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica que se une a dicha proteína, inhibiendo así el crecimiento de dicha célula.

154. El procedimiento de la reivindicación 153, en el que dicha célula es célula cancerosa.

155. El procedimiento de la reivindicación 153, en el que dicha proteína es expresada por dicha célula.

156. Los procedimientos de la reivindicación 153, en el que la unión de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína antagoniza una actividad potenciadora del crecimiento celular de dicha proteína.

157. El procedimiento de la reivindicación 153, en el que la unión de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína induce la muerte de dicha célula.

158. El procedimiento de la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

159. El procedimiento de la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

160. El procedimiento de la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

161. El procedimiento de la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica está conjugado con un agente inhibidor del crecimiento.

162. El procedimiento de la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica está conjugado con un agente citotóxico.

163. El procedimiento de la reivindicación 162, en el que dicho agente citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radiactivos y enzimas nucleolíticas.
- 5 164. El procedimiento de la reivindicación 162, en el que el agente citotóxico es una toxina.
165. El procedimiento de la reivindicación 164, en el que la toxina está seleccionada del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.
- 10 166. El procedimiento de la reivindicación 164, en el que la toxina es un maitansinoide.
167. El procedimiento de la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo se produce en bacterias.
168. El procedimiento de la reivindicación 153, en el que dicho anticuerpo se produce en células CHO.
- 15 169. El procedimiento de la reivindicación 153, en el que dicha proteína tiene:
- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- 20 (b) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- (c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su secuencia de péptido señal asociado;
- 25 (d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular o el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;
- (e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 92); o
- 30 (f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36).
- 35 170. Un procedimiento de tratar terapéuticamente un tumor en un mamífero, en el que el crecimiento de dicho tumor es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de una proteína que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos con:
- (a) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);
- 40 (b) el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- (c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su péptido señal asociado;
- 45 (d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su péptido señal asociado;
- (e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o
- 50 (f) un polipéptido codificado por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36), comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha proteína con un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica que se une a dicha proteína, tratando así eficazmente dicho tumor.
171. El procedimiento de la reivindicación 170, en el que dicha proteína es expresada por células de dicho tumor.
- 55 172. El procedimiento de la reivindicación 170, en el que la unión de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a dicha proteína antagoniza una actividad potenciadora del crecimiento celular de dicha proteína.
173. El procedimiento de la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 60 174. El procedimiento de la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

175. El procedimiento de la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

176. El procedimiento de la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica está conjugado con un agente inhibidor del crecimiento

177. El procedimiento de la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica está conjugado con un agente citotóxico.

178. El procedimiento de la reivindicación 177, en el que dicho agente citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radiactivos y enzimas nucleolíticas.

179. El procedimiento de la reivindicación 177, en el que el agente citotóxico es una toxina.

180. El procedimiento de la reivindicación 179, en el que la toxina está seleccionada del grupo que consiste en maitansinoide y caliqueamicina.

181. El procedimiento de la reivindicación 179, en el que la toxina es un maitansinoide.

182. El procedimiento de la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo se produce en bacterias.

183. El procedimiento de la reivindicación 170, en el que dicho anticuerpo se produce en células CHO.

184. El procedimiento de la reivindicación 170, en el que dicha proteína tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92);

(b) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), con su secuencia de péptido señal asociado;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO 92), que carece de su secuencia de péptido señal asociado;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36); o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO 36).

[0035] Otras realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes para el experto tras una lectura de la presente memoria descriptiva.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0036]

La Figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 36) de un ADNc de TAT201, en el que SEQ ID NO: 36 es un clon designado en el presente documento "ADN234441".

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 92) derivada de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 36 mostrada en la figura.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

I. Definiciones

[0037] Los términos "polipéptido TAT" y "TAT", como se usan en el presente documento y cuando van inmediatamente seguidos de una designación numérica, se refieren a diversos polipéptidos, en los que la designación completa (es decir, TAT/número) se refiere a secuencias de polipéptidos específicas como se describen en el presente documento. Los términos "polipéptido TAT/número" y "TAT/número" en el que el término "número" se

proporciona como una designación numérica real como se usa en el presente documento engloba polipéptidos de la secuencia nativa, variantes de polipéptidos y fragmentos de polipéptidos de la secuencia nativa y variantes de polipéptidos (que se definen adicionalmente en el presente documento). Los polipéptidos TAT descritos en el presente documento pueden aislarse de una variedad de fuentes, tales como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o prepararse por procedimientos recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido TAT" se refiere a cada polipéptido TAT/número individual desvelado en el presente documento. Todas las divulgaciones en esta memoria descriptiva que se refieren al "polipéptido TAT" se refieren a cada uno de los polipéptidos individualmente, además de conjuntamente. Por ejemplo, las descripciones de la preparación de, purificación de, privación de, formación de anticuerpos para o contra, formación de oligopéptidos de unión a TAT para o contra, formación de moléculas orgánicas de unión a TAT para o contra, administración de, composiciones que contienen, tratamiento de una enfermedad con, etc., se refieren a cada polipéptido de la invención individualmente. El término "polipéptido TAT" también incluye variantes de los polipéptidos TAT/número desvelados en el presente documento.

[0038] Un "polipéptido TAT de la secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido TAT correspondiente derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos TAT de la secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido TAT de la secuencia nativa TAT" engloba específicamente formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente del polipéptido TAT específico (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes que se producen naturalmente (por ejemplo, formas alternativamente cortadas y empalmadas) y variantes alélicas del polipéptido que se producen naturalmente. En ciertas realizaciones de la invención, los polipéptidos TAT de la secuencia nativa desvelados en el presente documento son polipéptidos de la secuencia nativa madura o de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa mostradas en las figuras adjuntas. Los codones de iniciación y de terminación (si se indican) se muestran en negrita y subrayados en las figuras. Los residuos de ácidos nucleicos indicados "N" en las figuras adjuntas son cualquier residuo de ácido nucleico. Sin embargo, aunque se muestra que los polipéptidos TAT desvelados en las figuras adjuntas empiezan con residuos de metionina designados en el presente documento como la posición de aminoácido 1 en las figuras, es imaginable y posible que otros residuos de metionina localizados tanto en la dirección 5' como en la dirección 3' de la posición de aminoácido 1 en las figuras puedan emplearse como residuo de aminoácido de partida para los polipéptidos TAT.

[0039] El "dominio extracelular" o "DEC" del polipéptido TAT se refiere a una forma del polipéptido TAT que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplásmicos. Generalmente, un DEC del polipéptido TAT tendrá menos del 1% de tales dominios transmembrana y/o citoplásmicos y preferentemente tendrá menos del 0,5% de tales dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos TAT de la presente invención se identifica con arreglo a criterios rutinariamente empleados en la materia para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero lo más probable no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquiera de los dos extremos del dominio como se identifica inicialmente en el presente documento. Opcionalmente, por tanto, un dominio extracelular de un polipéptido TAT puede contener aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquier lado del límite del dominio transmembrana/dominio extracelular como se identifica en los ejemplos o memoria descriptiva, y tales polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y ácido nucleico que los codifica, son contemplados por la presente invención.

[0040] La localización aproximada de los "péptidos señal" de los diversos polipéptidos TAT desvelados en el presente documento puede mostrarse en la presente memoria descriptiva y/o las figuras adjuntas. Sin embargo, se observa que puede variar el límite del extremo C de un péptido señal, pero lo más probable no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier lado del límite del extremo C del péptido señal como se identifica inicialmente en el presente documento, en el que el límite del extremo C del péptido señal puede identificarse con arreglo a criterios rutinariamente empleados en la materia para identificar ese tipo de elemento de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen y col., Prot. Eng. 10:1-6(1997) y von Heinje y col., Nucl. Acids. Res., 14:4683-4690 (1986)). Además, también se reconoce que, en algunos casos, la escisión de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es enteramente uniforme, produciendo más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros en los que el péptido señal se escinde dentro de no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier lado del límite del extremo C del péptido señal como se identifica en el presente documento, y los polinucleótidos que los codifican, son contemplados por la presente invención.

[0041] "Variante de polipéptido TAT" significa un polipéptido TAT, preferentemente un polipéptido TAT activo, como se define en el presente documento que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos con una secuencia de polipéptidos TAT de la secuencia nativa de longitud completa como se desvela en el presente documento, una secuencia de polipéptidos TAT que carece del péptido señal como se desvela en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido TAT, con o sin el péptido señal, como se desvela en el presente documento, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptidos TAT de longitud completa como se desvela en el presente documento (tal como aquellos codificados por un ácido nucleico que

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

[0042] “Porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos” con respecto a las secuencias de polipéptidos TAT identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos TAT específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y sin considerar sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencias. El alineamiento con el fin de determinar la identidad de secuencias de aminoácidos en porcentaje puede lograrse de diversas formas que están dentro de la habilidad en la materia, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo con respecto a la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines en el presente documento, los valores de identidad de secuencias de aminoácidos en % se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 más adelante. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 más adelante ha sido presentado con documentación de usuario en la oficina de derechos de autor de EE.UU., Washington D.C., 20559, en la que está registrado bajo el nº de acceso de derechos de autor de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible por Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 más adelante. El programa ALIGN-2 debería compilarse para uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

[0043] En situaciones en las que ALIGN-2 se emplea para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencias de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción X/Y

en la que X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como apareamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencias de aminoácidos B con respecto a A. Como ejemplos de cálculos del % de identidad de secuencias de aminoácidos usando este procedimiento, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos designada “Proteína de comparación” con la secuencia de aminoácidos designada “TAT”, en la que “TAT” representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TAT hipotético de interés, “Proteína de comparación” representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contra el que se compara el polipéptido “TAT” de interés, y “X”, “Y” y “Z” representan cada uno residuos de aminoácidos hipotéticos diferentes. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

[0044] “Polinucleótido variante TAT” o “secuencia de ácidos nucleicos variante TAT” significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido TAT, preferentemente un polipéptido TAT activo, como se define en el presente documento y que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptidos TAT de la secuencia nativa de longitud completa como se desvela en el presente documento, una secuencia de polipéptidos TAT de la secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal como se desvela en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido TAT, con o sin el péptido señal, como se desvela en el presente documento, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptidos TAT de longitud completa como se desvela en el presente documento (tal como aquellas codificadas por un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificante completa para un polipéptido TAT de longitud completa). Generalmente, un polinucleótido variante TAT tendrá al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias de ácidos nucleicos, alternativamente al menos aproximadamente el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencias de ácidos nucleicos, con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptidos TAT de la secuencia nativa de longitud completa como se desvela en el presente documento, una secuencia de polipéptidos TAT de la secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal como se desvela en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido TAT, con o sin la secuencia señal, como se desvela en el presente documento, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptidos TAT de longitud completa como se desvela en el presente documento. Las variantes no engloban la secuencia de nucleótidos nativa.

[0045] Generalmente, los polinucleótidos variantes TAT tienen al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 ó 1000 nucleótidos de longitud, en los que en este contexto el término “aproximadamente” significa la longitud de secuencia de nucleótidos mencionada más o menos el 10% de esa longitud mencionada.

[0046] “Porcentaje (%) de identidad de secuencias de ácidos nucleicos” con respecto a secuencias de ácidos nucleicos que codifican TAT identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos de TAT de interés, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de ácidos nucleicos puede lograrse de diversas formas que están dentro de la habilidad en la materia, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Sin embargo, para los fines en el presente documento, los valores de identidad de secuencias de ácidos nucleicos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 más adelante. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 más adelante ha sido presentado con documentación de usuario en la oficina de derechos de autor de EE.UU., Washington D.C., 20559, en la que está registrado bajo el nº de acceso de derechos de autor de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible por Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 más adelante. El programa ALIGN-2 debería compilarse para uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

[0047] En situaciones en las que ALIGN-2 se emplea para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, el % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos C dada para, con o contra una secuencia de ácidos nucleicos D dada (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de ácidos nucleicos C dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos para, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos D dada) se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción W/Z

en la que W es el número de nucleótidos puntuados como apareamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de C y D, y en la que Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos de C con respecto a D no será igual al % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos de D con respecto a C. Como ejemplos de cálculos del % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos, las Tablas 4 y 5 demuestran cómo calcular el % de identidad

de secuencias de ácidos nucleicos de la secuencia de ácidos nucleicos designada “ADN de comparación” con la secuencia de ácidos nucleicos designada “ADN de TAT”, en la que “ADN de TAT” representa una secuencia de ácidos nucleicos que codifica TAT hipotético de interés, “ADN de comparación” representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico contra la que está siendo comparada la molécula de ácido nucleico de “ADN de TAT” de interés, y “N”, “L” y “V” representan cada uno nucleótidos hipotéticos diferentes. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

[0048] En otras realizaciones, polinucleótidos variantes TAT son moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido TAT y que pueden hibridarse, preferentemente bajo condiciones de hibridación y lavado rigurosas, con secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido TAT de longitud completa como se desvela en el presente documento. Los polipéptidos variantes TAT pueden ser aquellos que están codificados por un polinucleótido variantes TAT.

[0049] El término “región codificante de longitud completa” cuando se usa en referencia a un ácido nucleico que codifica un polipéptido TAT se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido TAT de longitud completa de la invención (que se muestra frecuentemente entre codones de iniciación y terminación, ambos incluidos, en las figuras adjuntas). El término “región codificante de longitud completa” cuando se usa en referencia a un ácido nucleico depositado en la ATCC se refiere a la porción que codifica el polipéptido TAT del ADNc que se inserta en el vector depositado en la ATCC (que se muestra frecuentemente entre codones de iniciación y terminación, ambos incluidos, en las figuras adjuntas).

[0050] “Aislado” cuando se usa para describir los diversos polipéptidos TAT desvelados en el presente documento significa polipéptido que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o internos usando un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del polipéptido TAT no estará presente. Generalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

[0051] Un ácido nucleico que codifica el polipéptido TAT “aislado” u otro ácido nucleico que codifica polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está generalmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico que codifica polipéptido. Una molécula de ácido nucleico codificante de polipéptido aislado es distinta en la forma o entorno en la que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de polipéptido aislado se distinguen de la molécula de ácido nucleico codificante de polipéptido específico ya que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico codificante de polipéptido aislado incluye moléculas de ácidos nucleicos codificantes de polipéptido contenidas en células que generalmente expresan el polipéptido en el que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales.

[0052] El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente ligada en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes incluyen, por ejemplo, una secuencia promotora, opcionalmente una operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0053] El ácido nucleico está “operativamente ligado” cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está operativamente ligado a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente ligado a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está operativamente ligado a una secuencia codificante si está posicionado de forma que facilite la traducción. Generalmente, “operativamente ligado” significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La ligación se lleva a cabo por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, los adaptadores o ligadores de oligonucleótidos sintéticos se usan según la práctica convencional.

[0054] La “rigurosidad” de reacciones de hibridación puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración de sales. En general, sondas más largas requieren mayores temperaturas para la hibridación apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan menores temperaturas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para la re-hibridación cuando las cadenas complementarias están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de identidad deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, de esto resulta que temperaturas relativas mayores tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas menores menos. Para detalles adicionales y la explicación de la rigurosidad de reacciones de hibridación véase Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0055] “Condiciones rigurosas” o “condiciones de alta rigurosidad”, como se define en el presente documento, pueden identificarse por aquellas que (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para lavar, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio al 0,1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante tal como formamida, por ejemplo, 50% (vol/vol) de formamida con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; (3) hibridación durante la noche en una disolución que emplea formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, 5 x disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con un lavado de 10 minutos a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato de sodio) seguido por un lavado de alta rigurosidad de 10 minutos que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

[0056] “Condiciones moderadamente rigurosas” pueden identificarse como se describe por Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, e incluyen el uso de una disolución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es incubación durante la noche a 37°C en una disolución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37,50°C. El experto en la técnica reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para adaptar factores tales como la longitud de sonda y similares.

[0057] El término “epítipo marcado” cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido TAT o anticuerpo anti-TAT fusionado a un “polipéptido de marca”. El polipéptido de marca tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el que puede prepararse un anticuerpo, aunque es suficientemente corto de forma que no interfiere con la actividad del polipéptido con el que está fusionado. El polipéptido de marca también es casi preferentemente único, de manera que el anticuerpo no reacciona sustancialmente de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos de marca adecuados tienen generalmente al menos seis residuos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

[0058] “Activo” o “actividad” para los fines en el presente documento se refiere a forma(s) de un polipéptido TAT que retiene(n) una actividad biológica y/o inmunológica de TAT nativo o que se produce(n) naturalmente, en el que actividad “biológica” se refiere a una función biológica (tanto inhibidora como estimulante) producida por un TAT nativo o que se produce naturalmente distinta de la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un TAT nativo o que se produce naturalmente, y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un TAT nativo o que se produce naturalmente.

[0059] El término “antagonista” se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice parcialmente o completamente una actividad biológica de un polipéptido TAT nativo desvelado en el presente documento. De un modo similar, el término “agonista” se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido TAT nativo desvelado en el presente documento. Moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos agonistas o antagonistas o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos TAT nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido TAT pueden comprender poner en contacto un polipéptido TAT con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas al polipéptido TAT.

[0060] “Tratar” o “tratamiento” o “alivio” se refieren tanto a tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas, en el que el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) la afección o trastorno patológico elegido como diana. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno, además de aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los cuales va a prevenirse el trastorno. Un sujeto o mamífero es “tratado” satisfactoriamente para un cáncer que expresa polipéptido TAT si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT según los procedimientos de la presente invención, el paciente muestra reducción observable y/o medible en, o ausencia de, uno o más de los siguientes: reducción en el número de células cancerosas o ausencia de células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentizar hasta cierto grado y preferentemente detener) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos que incluyen la diseminación del cáncer en tejido blando y hueso; inhibición (es decir, ralentizar hasta cierto grado y preferentemente detener) de la metástasis tumoral; inhibición, hasta cierto grado, del crecimiento tumoral; y/o alivio hasta cierto grado de uno o más de los síntomas asociados al cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas, y mejora en la calidad de vida. Hasta el punto de que el anticuerpo anti-TAT u oligopéptido de unión a TAT pueda prevenir el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La reducción de estos signos o síntomas también puede ser notada por el paciente.

[0061] Los parámetros anteriores para evaluar el tratamiento satisfactorio y la mejora en la enfermedad son fácilmente medibles por procedimientos rutinarios familiares para un médico. Para terapia del cáncer, la eficacia puede medirse, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR). Las metástasis pueden determinarse por pruebas de estadificación y por barridos óseos y pruebas para el nivel de calcio y otras enzimas para determinar la diseminación al hueso. También pueden hacerse barridos de CT para buscar la diseminación a la pelvis y ganglios linfáticos en el área. La radiografía del tórax y la medición de los niveles de enzimas en el hígado mediante procedimientos conocidos se usan para buscar metástasis a los pulmones e hígado, respectivamente. Otros procedimientos rutinarios para monitorizar la enfermedad incluyen ultrasonografía transrectal (TRUS) y biopsia transrectal con aguja (TRNB).

[0062] Para cáncer de vejiga, que es un cáncer más localizado, los procedimientos para determinar el progreso de la enfermedad incluyen evaluación citológica urinaria por cistoscopia, monitorización para la presencia de sangre en la orina, visualización del tracto urotelial por sonografía o un pielograma intravenoso, tomografía computerizada (CT) y resonancia magnética nuclear (RMN). La presencia de metástasis distantes puede evaluarse por CT del abdomen, radiografía de tórax u obtención de imágenes por radionúclidos del esqueleto.

[0063] Administración “crónica” se refiere a la administración del (de los) agente(s) en un modo continuo a diferencia de un modo de dosis únicas, de manera que se mantenga el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un periodo de tiempo prolongado. Administración “intermitente” es el tratamiento que no se hace consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

[0064] “Mamífero” para fines de tratamiento de, alivio de los síntomas de o diagnóstico de un cáncer se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero que incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deporte o mascotas tales como perros, gatos, reses, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es el ser humano.

[0065] Administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

[0066] “Vehículos” como se usa en el presente documento incluye vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Frecuentemente, el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución tamponada acuosa a pH. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS®.

[0067] Por “fase sólida” o “soporte sólido” se indica una mezcla no acuosa con la que un anticuerpo, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT de la presente invención puede adherirse o unirse. Ejemplos de fases sólidas englobadas en el presente documento incluyen aquellas formadas parcialmente o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa),

poliacrilamidas, poliestireno, poli(alcohol vinílico) y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas tales como aquellas descritas en la patente de EE.UU. n° 4.275.149.

[0068] Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para la administración de un fármaco (tal como un polipéptido TAT, un anticuerpo para el mismo o un oligopéptido de unión a TAT) a un mamífero. Los componentes del liposoma está comúnmente dispuestos en una formación de bicapa similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas.

[0069] Una molécula "pequeña" o molécula orgánica "pequeña" se define en el presente documento por tener un peso molecular inferior a aproximadamente 500 Dalton.

[0070] Una "cantidad eficaz" de un polipéptido, anticuerpo, oligopéptido de unión a TAT, molécula orgánica de unión a TAT o un agonista o antagonista del mismo como se desvela en el presente documento es una cantidad suficiente para llevar a cabo un fin específicamente establecido. Un "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente y de una forma rutinaria, en relación con el fin establecido.

[0071] El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, oligopéptido de unión a TAT, molécula orgánica de unión a TAT u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto grado y preferentemente detener) metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto grado uno o más de los síntomas asociados al cáncer. Véase la definición en el presente documento de "tratar". Hasta el punto de que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes puede ser citostático y/o citotóxico.

[0072] Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti-TAT, polipéptido TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT es una cantidad que puede inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumor, por ejemplo, célula cancerosa, tanto *in vitro* como *in vivo*. Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti-TAT, polipéptido TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT para los fines de inhibir el crecimiento celular neoplásico puede determinarse empíricamente y de un modo rutinario.

[0073] Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-TAT, polipéptido TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT es una cantidad que puede producir la destrucción de una célula, especialmente tumor, por ejemplo, célula cancerosa, tanto *in vitro* como *in vivo*. Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-TAT, polipéptido TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT para los fines de inhibir el crecimiento celular neoplásico puede determinarse empíricamente y de un modo rutinario.

[0074] El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-TAT individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-TAT con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-TAT monocatenarios y fragmentos de anticuerpos anti-TAT (véase más adelante), en tanto que presenten la actividad biológica o inmunológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa indistintamente con anticuerpo en el presente documento.

[0075] Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95% en peso del anticuerpo como se ha determinado, por ejemplo, por el procedimiento de Lowry, y lo más preferido a más del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o interna usando un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, generalmente, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

[0076] La unidad de anticuerpo de 4 cadenas básica es una glucoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de la unidad

heterotetramérica básica junto con un polipéptido adicional llamado cadena J y, por tanto, contienen 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades de 4 cadenas básicas junto con la cadena J). En el caso de IgG, la unidad de 4 cadenas tiene generalmente aproximadamente 150.000 dalton. Cada cadena L está ligada a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están ligadas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro entre cadenas regularmente separadas. Cada cadena H tiene en el extremo N un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. V_L está alineado con V_H y C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una superficie de separación entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. El emparejamiento de V_H y V_L juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

[0077] La cadena L de cualquier especie vertebrada puede asignarse a uno de los dos tipos claramente distintos llamados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases basándose en las diferencias relativamente menores en la secuencia y función de C_H , por ejemplo, los seres humanos expresan las siguiente subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

[0078] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables se diferencien ampliamente en la secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a través de la extensión de 110 aminoácidos de los dominios variables. En su lugar, las regiones V consisten en estiramientos relativamente invariantes llamados regiones estructurales (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de hoja β , conectados por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de hoja β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0079] El término "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende los residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en V_L , y aproximadamente 1-35 (H1), 30-65 (H2) y 95-102 (H3) en V_H ; Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en V_L , y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en V_H ; Chothia y Lesk J. Mol, Biol, 196:901-917 (1987)).

[0080] El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminar por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención pueden prepararse mediante la metodología de hibridoma descrita por primera vez por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o pueden prepararse usando procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas eucariotas animales o vegetales (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de

bibliotecas de anticuerpos de fagos usando, por ejemplo, las técnicas descritas en Clackson y col., *Nature*; 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

5 **[0081]** Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que presenten la actividad biológica deseada (véase la patente de EE.UU. n° 4.816.567; y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "privatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, etc.) y secuencias de la región constante humanas.

15 **[0082]** Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión a antígeno, además de un C_L y al menos dominios constantes de la cadena pesada, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de la secuencia nativa humana) o variante de la secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

20 **[0083]** Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto que comprende preferentemente la región de unión a antígeno o región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véanse la patente de EE.UU. n° 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata y col., *Protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

30 **[0084]** La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos llamados fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L entera junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo da un único fragmento F(ab')₂ grande que se corresponde aproximadamente con dos fragmentos Fab ligados por disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y todavía pueden reticularse con el antígeno. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por tener pocos residuos adicionales en el extremo carboxi del dominio C_{H1} que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para Fab' en el que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes poseen un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos se produjeron originariamente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellas. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

40 **[0085]** El fragmento Fc comprende las porciones del extremo carboxi de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc, región que también es la parte reconocida por receptores de Fc (FcR) encontrados sobre ciertos tipos de células.

45 **[0086]** "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de y de unión a antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de la región variable de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras en estrecha asociación no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles, cada uno de la cadena H y L) que contribuyen a los residuos de aminoácidos para la unión a antígeno y confieren especificidad de unión del antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse a antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión entero.

55 **[0087]** "Fv monocatenario", también abreviado "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido de sFv comprende además un polipéptido ligador entre los dominios V_H y V_L que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, arriba.

60 **[0088]** El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo precedente) con ligadores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L de forma que se logre el emparejamiento entre cadenas, pero no dentro de las cadenas, de los

dominios V, produciendo un fragmento bivalente, es decir, fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "cruzados" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas de polipéptidos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO93/11161; y Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

[0089] Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen la mínima secuencia derivada del anticuerpo no humano. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad por anticuerpo deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para perfeccionar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, correspondiéndose todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véase Jones y col., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

[0090] Un "anticuerpo dependiente de especie", por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE humana de mamífero, es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (K_d) no superior a aproximadamente 1×10^{-7} M, preferentemente no superior a aproximadamente 1×10^{-4} y lo más preferentemente no superior a aproximadamente 1×10^{-9} M), pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos que se han definido anteriormente, pero preferentemente es un anticuerpo humanizado o humano.

[0091] Un "oligopéptido de unión a TAT" es un oligopéptido que se une, preferentemente específicamente, a un polipéptido TAT como se describe en el presente documento. Los oligopéptidos de unión a TAT pueden sintetizarse químicamente usando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o pueden prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a TAT tienen normalmente al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100 aminoácidos de longitud o más, en el que tales oligopéptidos pueden unirse, preferentemente específicamente, a un polipéptido TAT como se describe en el presente documento. Los oligopéptidos de unión a TAT pueden identificarse sin experimentación adicional usando técnicas muy conocidas. A este respecto, se observa que técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que pueden unirse específicamente a un polipéptido diana son muy conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; publicaciones PCT n° WO 84A/03506 y WO84/03564; Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen y col., en Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen y col., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs y col., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. y col. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. y col. (1991) Nature, 352:624; Marks, J. D. y col. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

[0092] Una "molécula orgánica de unión a TAT" es una molécula orgánica distinta de un oligopéptido o anticuerpo como se define en el presente documento que se une, preferentemente específicamente, a un polipéptido TAT como se describe en el presente documento. Las moléculas orgánicas de unión a TAT pueden identificarse y sintetizarse químicamente usando metodología conocida (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a TAT son normalmente inferiores a aproximadamente 2000 dalton de tamaño, alternativamente inferiores a aproximadamente 1500, 750, 500, 250 ó 200 dalton de tamaño, en las que tales moléculas orgánicas que pueden unirse, preferentemente específicamente, a un polipéptido TAT como se describe en el presente documento pueden identificarse sin experimentación adicional usando técnicas muy

conocidas. A este respecto, se observa que técnicas para cribar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que pueden unirse a un polipéptido diana son muy conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO00/00823 y WO00/39585).

5 **[0093]** Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica “que se une” a antígeno de interés, por ejemplo, un antígeno diana de polipéptido asociado a tumor, es uno que se une al antígeno con suficiente afinidad de forma que el oligopéptido de anticuerpo u otra molécula orgánica es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en la elección como diana de una célula o tejido que expresa el antígeno, y no reacciona significativamente de forma cruzada con otras proteínas. En tales realizaciones, el grado de la unión del anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una proteína “no diana” será inferior a aproximadamente el 10% de la unión del anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a su proteína diana particular como se ha determinado por análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) o radioinmuno precipitación (RIA). Con respecto a la unión de un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una molécula diana, el término “unión específica” o “se une específicamente a” o es “específico para” un polipéptido particular o un epítope sobre un polipéptido diana particular significa la unión que es mediblemente diferente de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse por la competencia con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana marcada con una sonda es competitivamente inhibida por la diana sin marcar en exceso. El término “unión específica” o “se une específicamente a” o es “específico para” un polipéptido o un epítope particular sobre un polipéptido diana particular como se usa en el presente documento puede presentarse, por ejemplo, por una molécula que tiene una K_d para la diana de al menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-12} M, o superior. En una realización, el término “unión específica” se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido o epítope particular sobre un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítope de polipéptido.

30 **[0094]** Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que “inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan un polipéptido TAT” o un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica “inhibidora del crecimiento” es una que produce inhibición medible del crecimiento de células cancerosas que expresan o que expresan en exceso el polipéptido TAT apropiado. El polipéptido TAT puede ser un polipéptido transmembrana expresado sobre la superficie de una célula cancerosa o puede ser un polipéptido que se produce y es secretado por una célula cancerosa. Los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos o moléculas orgánicas inhibidoras del crecimiento preferidas inhiben el crecimiento de células tumorales que expresan TAT más del 20%, preferentemente de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 50%, e incluso más preferentemente más del 50% (por ejemplo, de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 100%) con respecto al control apropiado, siendo normalmente el control células tumorales no tratadas con el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que se prueba. En una realización, la inhibición del crecimiento puede medirse a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 $\mu\text{g/ml}$ o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, en la que la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de células tumorales *in vivo* puede determinarse de diversas formas tal como se describe en la sección de ejemplos experimentales más adelante. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-TAT a aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal produce la reducción en el tamaño del tumor o proliferación de células tumorales en el plazo de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferentemente en el plazo de aproximadamente 5 a 30 días.

50 **[0095]** Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que “induce apoptosis” es una que induce muerte celular programada como se ha determinado por la unión de anexina V, fragmentación de ADN, encogimiento de células, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación de células y/o formación de vesículas de membrana (llamados cuerpos apoptóticos). La célula es una que normalmente expresa en exceso un polipéptido TAT. Preferentemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de próstata, mama, ovario, estómago, endometrio, pulmón, riñón, colon, vejiga. Están disponibles diversos procedimientos para evaluar los acontecimientos celulares asociados a la apoptosis. Por ejemplo, la translocalización de fosfatidilserina (PS) puede medirse por la unión a anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse por fragmentación de ADN; y la condensación nuclear/de cromatina junto con la fragmentación de ADN puede evaluarse por cualquier aumento en células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que induce apoptosis es una que produce aproximadamente 2 a 50 veces, preferentemente aproximadamente 5 a 50 veces, y lo más preferentemente aproximadamente 10 a 50 veces, de inducción de unión a anexina con respecto a célula sin tratar en un ensayo de unión a anexina.

[0096] Las “funciones efectoras” de los anticuerpos se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia nativa o región Fc de variante de secuencias de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

[0097] “Citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo” o “ADCC” se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada unida sobre receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos espontáneos (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que lleva antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos “arman” las células citotóxicas y son absolutamente requeridos para tal destrucción. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan Fc γ RIII solo, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE.UU. n° 5.500.362 ó 5.821.337. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos espontáneos (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes y col. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

[0098] “Receptor Fc” o “FcR” describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, que incluyen variantes alélicas y alternativamente formas cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un “receptor activador”) y Fc γ RIIB (un “receptor inhibidor”) que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activador Fc γ RIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptores basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase la revisión M. en Daéron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-492 (1991); Capel y col., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); y de Haas y col., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Otros FcR que incluyen aquellos que van a identificarse en el futuro están englobados por el término “FcR” en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., *J. Immunol.*, 117:587 (1976); y Kim y col., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

[0099] Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos Fc γ RIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre de periférica (PBMC), linfocitos citolíticos espontáneos (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose PBMC y linfocitos NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre.

[0100] “Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta del complemento clásica se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno relacionado. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

[0101] Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B, cáncer cerebral, además de cabeza y cuello, y metástasis asociadas.

[0102] Los términos “trastorno proliferativo de células” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que están asociados a algún grado de proliferación de células anormales. En una realización, el trastorno proliferativo de células es cáncer.

5 **[0103]** “Tumor”, como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásico, tanto maligno como benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.

[0104] Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que “induce muerte celular” es una que hace que una célula viable se convierta en no viable. La célula es una que expresa un polipéptido TAT, preferentemente una célula que expresa en exceso un polipéptido TAT con respecto a una célula normal del mismo tipo de tejido. El polipéptido TAT puede ser un polipéptido transmembrana expresado sobre la superficie de una célula cancerosa o puede ser un polipéptido que se produce y es secretado por una célula cancerosa. Preferentemente, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, de glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroideas, pancreática o de vejiga. La muerte celular *in vitro* puede determinarse en ausencia de complemento y células efectoras inmunitarias para distinguir muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por tanto, el ensayo para muerte celular puede realizarse usando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunitarias. Para determinar si el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica puede inducir muerte celular, la pérdida de integridad de la membrana como se evalúa por captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (véase Moore y col. *Cytotechnology* 17:1-11 (1995)) o 7AAD puede evaluarse con respecto a células sin tratar. Los anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas inductoras de muerte celular preferidas son aquellas que inducen captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474.

[0105] Una “célula que expresa TAT” es una célula que expresa un polipéptido TAT endógeno o transfectado tanto sobre la superficie celular como en una forma secretada. Un “cáncer que expresa TAT” es un cáncer que comprende células que tienen un polipéptido TAT presente sobre la superficie celular o que produce y secreta un polipéptido TAT. Un “cáncer que expresa TAT” produce opcionalmente niveles suficientes de polipéptido TAT sobre la superficie de células del mismo, de forma que un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido u otra molécula orgánica puede unirse al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. En otra realización, un “cáncer que expresa TAT” produce y secreta opcionalmente niveles suficientes de polipéptido TAT, de forma que un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido u otra molécula orgánica antagonista puede unirse al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. Con respecto al último, el antagonista puede ser un oligonucleótido antisentido que reduce, inhibe o previene la producción y secreción del polipéptido TAT secretado por células tumorales. Un cáncer que “expresa en exceso” un polipéptido TAT es uno que tiene niveles significativamente mayores de polipéptido TAT en la superficie celular del mismo, o produce y secreta, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Tal expresión en exceso puede producirse por amplificación génica o por un aumento de la transcripción o traducción. La expresión en exceso del polipéptido TAT puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando el aumento de niveles de la proteína TAT presentes sobre la superficie de una célula, o secretados por la célula (por ejemplo, por un ensayo de inmunohistoquímica usando anticuerpos anti-TAT preparados contra un polipéptido TAT aislado que puede prepararse usando tecnología de ADN recombinante a partir de un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido TAT; análisis de FACS, etc.). Alternativamente o adicionalmente pueden medirse niveles de ácido nucleico o ARNm que codifica polipéptido TAT en la célula, por ejemplo, por hibridación *in situ* fluorescente usando una sonda basada en ácido nucleico correspondiente a un ácido nucleico que codifica TAT o el complemento del mismo; (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia Southern, transferencia Northern, o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También puede estudiarse la expresión en exceso del polipéptido TAT midiendo el antígeno liberado en un líquido biológico tal como suero, por ejemplo, usando ensayos basados en anticuerpos (véanse, por tanto, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.933.294 concedida el 12 de junio de 1990; documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991; patente de EE.UU. 5.401.638 concedida el 28 de marzo de 1995; y Sias y col., *J. Immunol. Methods* 132:73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, diversos ensayos *in vivo* están disponibles para el médico habitual. Por ejemplo, pueden exponerse células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con una marca detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y la unión del anticuerpo a las células en el paciente puede evaluarse, por ejemplo, por barrido externo para radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

55 **[0106]** Como se usa en el presente documento, el término “inmuno adhesina” designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y de unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heterólogo”) y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La

60

secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0107] La palabra “marca” cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que está directamente o indirectamente conjugado con el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica de forma que genere un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica “marcada”. La marca puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, marcas de radioisótopo o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

[0108] El término “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce destrucción de células. Está previsto que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos desvelados más adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida produce la destrucción de células tumorales.

[0109] Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa TAT, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan TAT en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S), tal como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs” de Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos previniendo la despolimerización, que produce la inhibición de la mitosis en células.

[0110] La “doxorubicina” es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-3,12-naftacenediona.

[0111] El término “citocina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas de polipéptidos tradicionales. Entre las citocinas están incluidas hormonas de crecimiento tales como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana de N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glucoproteínas tales como hormona estimulante del foliculo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral α y β ; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nerviosos tales como NGF- β ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores de polipéptidos que incluyen LSI y el ligando kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

[0112] El término “prospecto” se usa para referirse a instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias referentes al uso de tales productos terapéuticos.

Tabla 1

```

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

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

```

Tabla 1 (cont.)

```

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

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

#define DMAT         3      /* value of matching bases */
#define DMIS         0      /* penalty for mismatched bases */
#define DINSO        8      /* penalty for a gap */
#define DINSI         1      /* penalty per base */
#define PINSO        8      /* penalty for a gap */
#define PINSI         4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for del) */
    unsigned short x[MAXJMP];     /* base no. of jmp in seq x */
};

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

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

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

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

```

Tabla 1 (cont.)

```

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

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

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

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

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

    nw(); /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps(); /* get the actual jmps */
    print(); /* print stats, alignment */

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

```

main

Tabla 1 (cont.)

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    char          *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int           *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int           ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int           *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int           mis;               /* score for each type */
    int           ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register      id;                /* diagonal index */
    register      ij;                /* jmp index */
    register      *col0, *coll;      /* score for curr, last row */
    register      xx, yy;            /* index into seqs */

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

```

nw

Tabla 1 (cont.)

```

...NW
for (py = seqx[l], yy = 1; yy <= lenl; py++, yy++) {
  mis = col0[yy-1];
  if (dna)
    mis += (xbrn["px-A"]&xbrn["py-A"])? DMAT : DMIS;
  else
    mis += _day["px-A"]["py-A"];

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

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

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

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

```

...NW

Tabla 1 (cont.)

```

else if (dclx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = dclx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dclx;
    }
} else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

Tabla 1 (cont.)

```

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

#include "nw.h"

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

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

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

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

```

print

Tabla 1 (cont.)

```

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

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

```

Tabla 1 (cont.)

```

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

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

```

...getmat ,

pr_align

Tabla 1 (cont.)

```

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

```

Tabla 1 (cont.)

```

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

```

...dumpblock

nums

putline

Tabla 1 (cont.)

```

int          i;
register char *px;

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

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

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

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(no[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

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

```

...putline

stars

Tabla 1 (cont.)

```

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

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;

    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

```

stripname

Tabla 1 (cont.)

```

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

char   *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jimps */
FILE   *fj;
int     cleanup();                          /* cleanup tmp file */
long    lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                  cleanup
{
    int    i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char   *
getseq(file, len)                           getseq
{
    char   *file; /* file name */
    int    *len; /* seq len */

    char    line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int     natgc, tlen;
    FILE    *fp;
    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

```

Tabla 1 (cont.)

```

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

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

```

...getseq

g_calloc

readjmps

Tabla 1 (cont.)

```

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

```

Tabla 1 (cont.)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix) writejumps
{
    int    ix;

    char   *mktemp();

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

```

5

Tabla 2

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

% de identidad de secuencias de aminoácidos =

10 (el número de residuos de aminoácidos que se aparean idénticamente entre las dos secuencias de polipéptidos como se determina por ALIGN-2) dividido entre (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido TAT) =

5 dividido entre 15 = 33,3%

15

Tabla 3

TAT	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXYYYYZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

% de identidad de secuencias de aminoácidos =

20 (el número de residuos de aminoácidos que se aparean idénticamente entre las dos secuencias de polipéptidos como se determina por ALIGN-2) dividido entre (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido TAT) =

5 dividido entre 10 = 50%

25

Tabla 4

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

% de identidad de secuencias de aminoácidos =

30 (el número de nucleótidos que se aparean idénticamente entre las dos secuencias de ácidos nucleicos como se determina por ALIGN-2) dividido entre (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de TAT-ADN) =

6 dividido entre 14 = 42,9%

Tabla 5

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

5 % de identidad de secuencias de aminoácidos =

(el número de nucleótidos que se aparean idénticamente entre las dos secuencias de ácidos nucleicos como se determina por ALIGN-2) dividido entre (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de TAT-ADN) =

10

4 dividido entre 12 = 33,3%

II. Composiciones y procedimientos de la invención

15 A. Anticuerpos anti-TAT

[0113] En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos anti-TAT que pueden usarse en el presente documento como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. Anticuerpos a modo de ejemplo incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

20

1. Anticuerpos policlonales

[0114] Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante (especialmente cuando se usan péptidos sintéticos) con una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno puede conjugarse con hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil-sulfosuccinimida (conjugación por residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (por residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1 \text{N}=\text{C}=\text{NR}$ en la que R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

30

[0115] Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después, los animales se sangran y el suero se ensaya para título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta la meseta del título. También pueden prepararse conjugados en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. Por tanto, agentes agregantes tales como alumbre se usan adecuadamente para potenciar la respuesta inmunitaria.

35

40

2. Anticuerpos monoclonales

[0116] Los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256:495 (1975), o resto no proteináceo mediante procedimientos de ADN recombinante (patente de EE.UU. n° 4.816.567).

45

[0117] En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado tal como un hámster se inmuniza como se ha descrito anteriormente para provocar que los linfocitos produzcan o puedan producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y luego se fusionan con una línea de células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

50

[0118] Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado, medio que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma sin fusionar parentales (también denominado componente de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

55

60

[0119] Células de mieloma de componentes de fusión preferidos son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio selectivo que selecciona contra las células parentales sin fusionar. Líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y células SP-2 y derivados, por ejemplo, células X63-Ag8-653 disponibles de la Colección americana de cultivos tipo, Manassas, Virginia, EE.UU. Las líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); y Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

[0120] El medio de cultivo en el que las células de hibridoma están cultivándose se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA).

[0121] La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard descrito en Munson y col., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

[0122] Una vez se han identificado las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante procedimientos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal, por ejemplo, por inyección i.p. de las células en ratones.

[0123] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A o proteína G-Sepharose) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

[0124] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven de fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión que entonces se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra forma proteína de anticuerpo para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col., Curr. Opin. Immunol., 5:256-262 (1993) y Plückthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

[0125] En otra realización, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., Nature, 348:552-554(1990). Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581-597(1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) por barajado de cadenas (Marks y col., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), además de infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridomas de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

[0126] El ADN que codifica el anticuerpo puede modificarse para producir polipéptidos de anticuerpos quiméricos o de fusión, por ejemplo, sustituyendo las secuencias del dominio constante de la cadena pesada y la cadena ligera humana (C_H y C_L) por las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. n° 4.816.567; y Morrison, y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)); o fusionando la secuencia codificante de inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias de polipéptido de no inmunoglobulina pueden sustituirse con los dominios constantes de un anticuerpo; o están sustituidas con los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

[0127] Los anticuerpos anti-TAT de la invención pueden comprender adicionalmente anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidas por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que ni se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o de la región estructural importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un dominio variable, y normalmente dos, correspondiéndose todas o sustancialmente todas las regiones CDR con las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 132:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

[0128] Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos no humanos de aminoácidos se denominan frecuentemente en lo sucesivo residuos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven y col., *Science*, 239:1534-1536 (1998)] sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. n° 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

[0129] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la producción de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad y respuesta HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando el anticuerpo está previsto para uso terapéutico humano. Según el llamado procedimiento "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocido. La secuencia del dominio V humana que está más próxima a la del roedor es identificada y la región estructural humana (FR) en su interior es aceptada para el anticuerpo humanizado (Sims y col. (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia y col. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.* 151:2623 (1993)).

[0130] Es adicionalmente importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento preferido, anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias del receptor y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como aumento de la afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y principalmente sustancialmente implicados en influir la unión a antígeno.

[0131] Se contemplan diversas formas de un anticuerpo anti-TAT humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está opcionalmente conjugado con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoc conjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado

puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

[0132] Como una alternativa a la humanización pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que tras la inmunización pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en tales ratones mutantes en la línea germinal producirá la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann y col., Year in Immuno, 7:33 (1993); las patentes de EE.UU. nº 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; y el documento WO 97/17852.

[0133] Alternativamente, la tecnología de expresión en fago (McCafferty y col., Nature 348, 552-553 [1990]) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro* a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes sin inmunizar. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en marco en un gen de la proteína de la cubierta tanto principal como minoritario de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd, y se muestran como fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. Las muestras de fago pueden realizarse en una variedad de formas, revisadas en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes de V para la expresión en fago. Clackson y col., Nature 352, 624-628 (1991) aislaron una matriz diferente de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes de V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos sin inmunizar y los anticuerpos con respecto a una matriz diferente de antígenos (incluyendo autoantígenos) pueden aislarse esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12, 725-734 (1993). Véase, por tanto, las patentes de EE.UU. nº 5.565.332 y 5.573.905.

[0134] Como se trata anteriormente, los anticuerpos humanos también pueden generarse por linfocitos E activados *in vitro* (véanse las patentes de EE.UU. 5.567.610 y 5.229.275).

4. Fragmentos de anticuerpos

[0135] En ciertas circunstancias hay ventajas de uso de fragmentos de anticuerpos en vez de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite la rápida eliminación, y puede conducir al acceso mejorado a tumores sólidos.

[0136] Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan y col., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora ser directamente producidos por células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden todos expresarse en y secretarse de *E. coli*, permitiendo así la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos tratadas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de cultivo de células huésped recombinantes. El fragmento Fab y F(ab')₂ con elevada semivida *in vivo* que comprende residuos del epítopo de unión al receptor silvestre se describe en la patente de EE.UU. nº 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; patente de EE.UU. nº 5.571.894; y patente de EE.UU. nº 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por tanto, pueden ser adecuadas para la unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión de sFv para dar la fusión de una proteína efectora en tanto el extremo amino como el carboxi de un sFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, arriba. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.641.870. Tales anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5. Anticuerpos biespecíficos

[0137] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopes diferentes. Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítopes diferentes de una proteína TAT como se describe en el presente documento. Otros de tales anticuerpos pueden combinar un sitio de unión de TAT con un sitio de unión para otra proteína. Alternativamente, un brazo anti-TAT puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante sobre un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD3), o receptores de Fc para IgG (Fc γ R), tales como Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16), de manera que centren y localicen mecanismos de defensa celular para la célula que expresa TAT. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan TAT. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a TAT y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab') $_2$).

[0138] El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo anti-ErbB2/anti-Fc γ RIII biespecífico y la patente de EE.UU. n° 5.837.234 desvela un anticuerpo anti-ErbB2/anti-Fc γ RI biespecífico. Un anticuerpo anti-ErbB2/Fc α biespecífico se muestra en el documento WO98/02463. La patente de EE.UU. n° 5.821.337 enseña un anticuerpo anti-ErbB2/anti-CD3 biespecífico.

[0139] Los procedimientos para producir anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina en los que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature 305:537 (1983)). Debido al surgido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace normalmente por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante embarazosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se desvelan en el documento WO 93/08829 y en Trauneker y col., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

[0140] Según un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios que combinan anticuerpo-antígeno) están fusionados a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferiblemente, la fusión es con un dominio constante de la cadena pesada de Ig que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C $_H2$ y C $_H3$. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (C $_H1$) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales produzca altos rendimientos o cuando las relaciones no tengan efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de cadenas deseada.

[0141] En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Esta solución se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

[0142] Según otro enfoque descrito en la patente de EE.UU. n° 5.731.168, la superficie de separación entre un par de moléculas de anticuerpos puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de separación preferida comprende al menos una parte del dominio C $_H3$. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la superficie de separación de la primera molécula de anticuerpo están sustituidos con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean sobre la superficie de separación de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales

como homodímeros.

[0143] Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para elegir como diana células del sistema inmunitario para células no deseadas (patente de EE.UU. n° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden producirse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica y se desvelan en la patente de EE.UU. n° 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

[0144] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico. Brennan y col., Science 229:81 (1985), describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditioi arsenito de sodio para estabilizar ditioles vecinos y prevenir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte entonces en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro Fab'-TNB derivado para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0145] El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992), describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. Por tanto, el anticuerpo biespecífico formado podía unirse a células que expresan en exceso el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, además de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano. También se han descrito diversas técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y entonces se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L por un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento están obligados a aparearse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formándose así dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv (sFv). Véase, Gruber y col., J. Immunol., 152:5368 (1994).

[0146] Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt y col., J. Immunol. 147:60 (1991).

6. Anticuerpos heteroconjugados

[0147] Los anticuerpos heteroconjugado también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos covalentemente unidos. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para elegir como diana células del sistema inmunitario para células no deseadas [patente de EE.UU. n° 4.676.980] y para el tratamiento de infección por el VIH [documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos puedan prepararse *in vitro* usando procedimientos conocidos en la química de proteínas sintéticas, que incluyen aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo y los desvelados, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 4.676.980.

7. Anticuerpos multivalentes

[0148] Un anticuerpo multivalente puede ser internalizado (y/o catabolizado) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención puede ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de los de la clase de IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden ser fácilmente producidos por expresión

recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno del extremo amino a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptidos (por ejemplo, dos cadenas de polipéptidos), en el que la(s) cadena(s) de polipéptidos comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender VD1-(X1)ⁿ-VD2-(X2)ⁿ-Fc en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender: cadena de VH-CH1-ligador flexible-VH-CH1-región Fc; o cadena de VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento comprende preferiblemente adicionalmente al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de la cadena ligera y, opcionalmente, además comprenden un dominio CL.

8. Ingeniería de la función efectora

[0149] Puede desearse modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, de forma que se potencie la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede lograrse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, el (los) residuo(s) de cisteína puede(n) introducirse en la región Fc, permitiendo así la formación del enlace disulfuro entre cadenas en esta región. Por tanto, el anticuerpo homodimérico generado puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción de células mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) elevadas. Véase Caron y col., J. Exp Med, 176:1191-1195(1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada también pueden prepararse usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff y col., Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, un anticuerpo puede manipularse, teniendo regiones Fc duales y así puede tener lisis del complemento y capacidades de ADCC potenciadas. Véase Stevenson y col., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989). Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo puede incorporarse un epítotope de unión al receptor silvestre en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5.739.277. Como se usa en el presente documento, el término "epítotope de unión al receptor silvestre" se refiere a un epítotope de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

9. Inmunoconjugados

[0150] La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

[0151] Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de modicina, alfa-sarcinas, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Está disponible una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Se preparan conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col. (1987) Science, 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metilidietilentríaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

[0152] Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

Maitansina y maitansinoides

[0153] En una realización preferida, un anticuerpo anti-TAT (longitud completa o fragmentos) de la invención está conjugado con una o más moléculas de maitansinoide.

[0154] Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. n° 3.896.111). Posteriormente se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de EE.UU. n° 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 4.137.230; 4.248.870; 4.236.746; 4.260.608; 4.263.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.313.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.234; 4.362.663; y 4.371.533.

Conjugados de maitansinoide-anticuerpo

[0155] En un intento por mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han conjugado con anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 233 B1, cuyas divulgaciones se incorporan expresamente en el presente documento por referencia. Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 ligado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se encontró que el conjugado era altamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunconjugados en los que un maitansinoide se conjugó mediante un ligador de disulfuro con el anticuerpo A7 murino que se une a un antígeno en líneas de células de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/*neu*. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Conjugados de anticuerpo anti-polipéptido TAT-maitansinoide (inmunconjugados)

[0156] Los conjugados de anticuerpo anti-TAT-maitansinoide se preparan ligando químicamente un anticuerpo anti-TAT con una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica de tanto el anticuerpo como la molécula de maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en potenciar la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente la función o solubilidad del anticuerpo, aunque incluso se esperaba que una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad con respecto al uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son muy conocidos en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Maitansinoides adecuados se desvelan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones de no patente citadas anteriormente en el presente documento. Maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tal como diversos ésteres de maitansinol.

[0157] Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide que incluyen, por ejemplo, los desvelados en la patente de EE.UU. n° 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B1, Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992). Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa o lábiles de esterasa, como se desvela en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose los grupos disulfuro y tioéter.

[0158] Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-

diisocianato) y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

5 **[0159]** El ligador puede unirse a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster mediante la reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en posición la C-3 del maitansinol o un análogo de maitansinol.

Caliqueamicina

15 **[0160]** Otro inmunoc conjugado de interés comprende un anticuerpo anti-TAT conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina puede producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones inferiores a picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina véanse las patentes de 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas a American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ^1_1 (Hinman y col., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode y col., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE.UU. anteriormente mencionadas a American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios de acción intracelular y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes por la internalización mediada por anticuerpos potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

25

Otros agentes citotóxicos

30 **[0161]** Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos anti-TAT de la invención incluyen BCNU, estreptozaocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida conjuntamente el complejo LL-E33288 descrito en las patentes de EE.UU. 5.053.394, 5.770.710, además de esperamicinas (patente de EE.UU. 5.877.296).

35 **[0162]** Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, curcina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

40 **[0163]** La presente invención contempla adicionalmente un inmunoc conjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; ADNsa).

45 **[0164]** Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Están disponibles una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu. Si el conjugado se usa para diagnóstico, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, Tc^{99m} o I¹²³, o una marca de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como obtención de imágenes de resonancia magnética, irm), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

50 **[0165]** Las radiomarcas u otras marcas pueden incorporarse en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como Tc^{99m} o I¹²³, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸ e In¹¹¹ pueden unirse por un residuo de cisteína en el péptido. Itrio-90 puede unirse por un residuo de lisina. El procedimiento IODOGEN (Fraker y col. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros procedimientos en detalle.

60 **[0166]** Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres

(tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un ligador lábil de ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador fotolábil, ligador de dimetilo o ligador que contiene disulfuro (Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992); patente de EE.UU. nº 5.208.020).

[0167] Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-TAT y agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado tanto adyacentes entre sí como separadas por una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0168] En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como estreptavidina) para la utilización en la elección previa como diana de tumores en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de limpieza y luego administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

10. Inmunoliposomas

[0169] Los anticuerpos anti-TAT desvelados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma está comúnmente dispuestos en una formación de bicapa similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describen en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); las patentes de EE.UU. nº 4.485.045 y 4.544.545; y el documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se desvelan en la patente de EE.UU. nº 5.013.556.

[0170] Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención con los liposomas como se describe en Martin y col., J. Biol. Chem, 257:1286-288 (1982) por una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está opcionalmente contenido dentro del liposoma. Véase Gabizon y col., J. National Cancer Inst, 81(19):1484 (1989).

B. Oligopéptidos de unión a TAT

[0171] Los oligopéptidos de unión a TAT de la presente invención son oligopéptidos que se unen, preferentemente específicamente, a un polipéptido TAT como se describe en el presente documento. Los oligopéptidos de unión a TAT pueden sintetizarse químicamente usando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o pueden prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a TAT tienen normalmente al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100 aminoácidos de longitud o más, en los que tales oligopéptidos pueden unirse, preferentemente específicamente, a un polipéptido TAT como se describe en el presente documento. Los oligopéptidos de unión a TAT pueden identificarse sin experimentación adicional usando técnicas muy conocidas. A este respecto se observa que técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptido para oligopéptidos que pueden unirse específicamente a una diana polipéptido son muy conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; publicaciones PCT nº WO84103506 y WO84/03564; Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998,4002 (1984); Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92:178-192 (1985); Geysen y col., en Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen y col., J. Immunol. Meth., 102:259-274(1987); Schoofs y col., J. Immunol., 140:611-616(1988), Cwirla, S.E. y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. y col. (1991) Biochemistry, 30:10832;

Clackson, T. y col. (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J.D. y col. (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang, A.S. y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363, y Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668).

[0172] A este respecto, la expresión en bacteriófago (fago) es una técnica muy conocida que permite cribar grandes bibliotecas de oligopéptidos para identificar miembro(s) de aquellas bibliotecas que pueden unirse específicamente a una diana de polipéptido. La expresión en fago es una técnica por la que polipéptidos variantes son expresados como proteínas de fusión para la proteína de la envuelta sobre la superficie de partículas de bacteriófago (Scott, J.K. y Smith, G. P. (1990) *Science* 249: 386). La utilidad de la expresión en fago se basa en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes de proteína selectivamente aleatorizadas (o ADNc clonados aleatoriamente) pueden clasificarse rápidamente y eficientemente para aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con afinidad alta. La expresión de bibliotecas de péptido (Cwirla, S. E. y col. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378) o proteína (Lowman, H.B. y col. (1991) *Biochemistry*, 30: 1 0832; Clackson, T. y col. (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. y col. (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang, A.S. y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363) en fago se ha usado para cribar millones de polipéptidos o oligopéptidos para aquellos con propiedades específicas de unión (Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668). La clasificación de bibliotecas de fagos de mutantes al azar requiere una estrategia para construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para la purificación por afinidad usando el receptor diana y un medio de evaluación de los resultados de los enriquecimientos de unión. Patentes de EE.UU. nº 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689 y 5.663.143.

[0173] Aunque la mayoría de los procedimientos de expresión en fago han usado fago filamentoso, también se conocen sistemas de expresión en fago lambdaide (documentos WO95/34683; U.S. 5.627.024), sistemas de expresión en fago T4 (Ren, Z-J. y col. (1998) *Gene* 215:439; Zhu, Z. (1997) *CAN* -33:534; Jiang, J. y col. (1997) *can* 128:44380; Ren, Z-J. y col. (1997) *CAN* 127:215644; Ren, Z-J. (1996) *Protein Sci.* 5:1833; Efimov, V. P. y col.: (1995) *Virus Genes* 10:173) y sistemas de expresión en fago T7 (Smith, G. P. y Scott, J.K (1993) *Methods in Enzymology*, 217, 228-257; documento U.S. 5.766.905).

[0174] Ahora se han desarrollado muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de la expresión en fago. Estas mejoras potencian la capacidad de sistemas de expresión para cribar bibliotecas de péptido para la unión a moléculas diana seleccionadas y para expresar proteínas funcionales con el potencial de cribar estas proteínas para propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatorios para las reacciones de expresión en fago (documento WO 98/14277) y se han usado bibliotecas de expresión en fago para analizar y controlar interacciones bimoleculares (documentos WO 98/120169; WO 98/20159) y propiedades de péptidos helicoidales obligados (documento WO 98/20036). El documento WO 97/35196 describe un procedimiento de aislamiento de un ligando de afinidad en el que una biblioteca de expresión en fago se pone en contacto con una disolución en la que el ligando se unirá a una molécula diana y una segunda disolución en la que el ligando de afinidad no se unirá a la molécula diana, para aislar selectivamente ligandos de unión. El documento WO 97/46251 describe un procedimiento de ciclos de selección de una biblioteca de expresión en fago aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad y luego aislamiento del fago de unión, seguido de un procedimiento de microadsorción usando pocillos de microplaca para aislar fago de unión de alta afinidad. También se ha informado del uso de proteína A de *Staphylococcus aureus* como marca de afinidad (Li y col. (1998) *Mol Biotech.*, 9:187). El documento WO 97/47314 describe el uso de bibliotecas de sustracción de sustrato para distinguir especificidades de enzima usando una biblioteca combinatoria que puede ser una biblioteca de expresión en fago. Un procedimiento para seleccionar enzimas adecuadas para su uso en detergentes usando expresión en fago se describe en el documento WO 97/09446. Procedimientos adicionales de selección de proteínas de unión específica se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.498.538, 5.432.018, y el documento WO 98/15833.

[0175] Los procedimientos de generación de bibliotecas de péptidos y el cribado de estas bibliotecas también se desvelan en las patentes de EE.UU. nº 5.723.286, 5.432.018, 5.580.717, 5.427.908, 5.498.530, 5.770.434, 5.734.018, 5.698.426, 5.763.192 y 5.723.323.

C. Moléculas orgánicas de unión a TAT

[0176] Las moléculas orgánicas de unión a TAT son moléculas orgánicas distintas de oligopéptidos o anticuerpos como se definen en el presente documento que se unen, preferentemente específicamente, a un polipéptido TAT como se describe en el presente documento. Las moléculas orgánicas de unión a TAT pueden identificarse y sintetizarse químicamente usando metodología conocida (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT nº WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a TAT tienen normalmente menos de aproximadamente 2000 dalton de tamaño, alternativamente menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 ó 200 dalton de tamaño, en las que tales moléculas orgánicas que pueden unirse, preferentemente específicamente, a un polipéptido TAT como se describe en el presente documento pueden identificarse sin experimentación adicional usando técnicas muy conocidas. A este respecto, se observa que técnicas para cribar bibliotecas de moléculas

orgánicas para moléculas que pueden unirse a una diana de polipéptido son muy conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT nº WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a TAT pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidracinas N-sustituídas, hidrazidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, ureas, carbamatos, carbonatos, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, haluros de arilo, sulfonatos de arilo, haluros de alquilo, sulfonatos de alquilo, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alquinos, dioles, aminoalcoholes, oxazolidinas, oxazolinas, tiazolidinas, tiazolininas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonyl, compuestos diazónicos, cloruros de ácido o similares.

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

[0177] Anteriormente se han descrito técnicas para generar anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas que se unen a polipéptidos TAT. Pueden seleccionarse adicionalmente anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas con ciertas características biológicas, según se desee.

[0178] Los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido u otra molécula orgánica de la invención pueden evaluarse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando células que expresan un polipéptido TAT tanto endógenamente como tras la transfección con el gen TAT. Por ejemplo, líneas celulares tumorales apropiadas y células transfectadas con TAT pueden tratarse con un anticuerpo monoclonal anti-TAT, oligopéptido u otra molécula orgánica de la invención a diversas concentraciones durante algunos días (por ejemplo, 2-7) y teñirse con violeta cristal o MTT o analizarse por algún otro ensayo colorimétrico. Otro procedimiento de medición de la proliferación sería comparar la captación de ³H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT de la invención. Después del tratamiento, las células se recogen y la cantidad de radiactividad incorporada en el ADN se cuantifica en un contador de centelleo. Controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibir el crecimiento de esa línea celular. La inhibición del crecimiento de células tumorales *in vivo* puede determinarse de diversas formas conocidas en la técnica. Preferentemente, la célula tumoral es una que expresa en exceso un polipéptido TAT. Preferentemente, el anticuerpo anti-TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT inhibirá la proliferación celular de una célula tumoral que expresa TAT *in vitro* o *in vivo* aproximadamente el 25-100% en comparación con la célula tumoral sin tratar, más preferentemente aproximadamente el 30-100%, e incluso más preferentemente aproximadamente el 50-100% o el 70-100%, en una realización, a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. La inhibición del crecimiento puede medirse a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, en el que la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-TAT a aproximadamente 1 pg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal produce la reducción en el tamaño del tumor o la reducción de la proliferación de células tumorales en el plazo de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferentemente en el plazo de aproximadamente 5 a 30 días.

[0179] Para seleccionar un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT que induce muerte celular, la pérdida de integridad de la membrana como se indica, por ejemplo, por captación de yoduro de propidio (YP), azul de tripano o 7AAD puede evaluarse con respecto al control. Un ensayo de captación de YP puede realizarse en ausencia de complemento y células efectoras inmunitarias. Las células tumorales que expresan el polipéptido TAT se incuban con medio solo o medio que contiene el anticuerpo anti-TAT apropiado (por ejemplo, a aproximadamente 10 µg/ml), oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT. Las células se incuban durante un periodo de tiempo de 3 días. Tras cada tratamiento, las células se lavan y se separan en alícuotas en 12 x 75 tubos tapados con filtro de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de grupos de células. Entonces, los tubos reciben YP (10 µg/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN® y el software FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Aquellos anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos de unión a TAT o moléculas orgánicas de unión a TAT que inducen niveles de muerte celular estadísticamente significativos como se ha determinado por captación de YP pueden seleccionarse como anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos de unión a TAT o moléculas orgánicas de unión a TAT inductores de muerte celular.

[0180] Para cribar anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas que se unen a un epítipo sobre un polipéptido TAT unido por un anticuerpo de interés puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1998). Este ensayo puede usarse para determinar si un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica de prueba se une al mismo sitio o epítipo que un anticuerpo anti-TAT conocido. Alternativamente o adicionalmente, el mapeo

de epítopes puede realizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de anticuerpos puede mutagenizarse tal como por cribado con alanina para identificar residuos de contacto. El anticuerpo mutante se prueba inicialmente para la unión con anticuerpo policlonal para garantizar el plegamiento apropiado. En un procedimiento diferente, los péptidos correspondientes a diferentes regiones de un polipéptido TAT pueden usarse en ensayos de competencia con los anticuerpos de prueba o con un anticuerpo de prueba y un anticuerpo con epítope sin caracterizar o conocido.

E. Terapia con profármacos mediada por enzimas dependientes de anticuerpos (ADEPT)

[0181] Los anticuerpos de la presente invención también puede usarse en ADEPT conjugando el anticuerpo con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO81/01145) en un fármaco anticanceroso activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07370 y la patente de EE.UU. nº 4.975.278.

[0182] El componente de enzima del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima que pueda actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierta en su forma citotóxica más activa.

[0183] Enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir no 5-fluorocitosina tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; enzimas que escinden hidratos de carbono tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres y penicilina amidasa tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", pueden usarse para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describen en el presente documento para administrar la abzima a una población de células tumorales.

[0184] Las enzimas de la presente invención puede unirse covalentemente a los anticuerpos anti-TAT por técnicas muy conocidas en la técnica tales como el uso de los reactivos de reticulación heterobifuncionales anteriormente tratados. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención ligada a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención pueden construirse usando técnicas de ADN recombinante muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger y col., Nature, 312: 604-608 (1984)).

F. Polipéptidos TAT de longitud completa

[0185] La presente invención también proporciona secuencias de nucleótidos recientemente identificadas y aisladas que codifican polipéptidos denominados en la presente solicitud polipéptidos TAT. En particular, se han identificado y aislado ADNc (de longitud parcial y completa) que codifican diversos polipéptidos TAT, como se desvela en más detalle en los ejemplos más adelante.

[0186] Como se desvela en los ejemplos más adelante, se han identificado diversos clones de ADNc en la ATCC. Las secuencias de nucleótidos reales de aquellos clones pueden ser fácilmente determinadas por el experto por secuenciación del clon depositado usando procedimientos rutinarios en la materia. La secuencia de aminoácidos predicha puede determinarse a partir de la secuencia de nucleótidos usando habilidad rutinaria. Para los polipéptidos TAT y ácidos nucleicos codificantes descritos en el presente documento, en algunos casos, los solicitantes han identificado lo que se cree que es el mejor marco de lectura identificable con la información de secuencia disponible en el momento.

G. Anticuerpo anti-TAT y variantes de polipéptido TAT

[0187] Además de los anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT de secuencia nativa de longitud completa descritos en el presente documento, se contempla que puedan prepararse variantes de anticuerpos anti-TAT y de polipéptidos TAT. Las variantes de anticuerpos anti-TAT y de polipéptidos TAT pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante, y/o mediante síntesis del anticuerpo o polipéptido deseado. Aquellos expertos en la materia apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar procesos

postraduccionales del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT tales como cambiar el número o la posición de sitios de glucosilación o alterar las características de anclaje a la membrana.

[0188] Las variaciones en los anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT descritas en el presente documento pueden hacerse, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y pautas para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican el anticuerpo o polipéptido que produce un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es mediante sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT. La orientación para determinar qué residuo de aminoácido puede insertarse, sustituirse o deleccionarse sin afectar adversamente la actividad deseada puede encontrarse comparando la secuencia del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT con las de moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios de secuencias de aminoácidos hechos en regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o delecciones puede estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse haciendo sistemáticamente inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y probando las variantes resultantes para la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

[0189] En el presente documento se proporcionan fragmentos de anticuerpos anti-TAT y de polipéptidos TAT. Tales fragmentos pueden estar truncados en el extremo N o extremo C, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con un anticuerpo o proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT.

[0190] Los fragmentos de anticuerpos anti-TAT y de polipéptidos TAT pueden prepararse por distintas técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados pueden sintetizarse químicamente. Una solución alternativa implica generar fragmentos de anticuerpos o polipéptidos por digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida por escindir proteínas en sitios definidos por residuos de aminoácidos particulares, o digiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Todavía otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica un fragmento de anticuerpo o polipéptido deseado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores de 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los fragmentos de anticuerpos anti-TAT y de polipéptidos TAT comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT nativo desvelado en el presente documento.

[0191] En realizaciones particulares, sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla 6 bajo el encabezamiento de Sustituciones preferidas. Si tales sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados Sustituciones a modo de ejemplo en la Tabla 6, o como se describe adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y los productos se criban.

Tabla 6

Residuo original	Sustitución a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser

Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

[0192] Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se llevan a cabo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una hoja o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la voluminosidad de la cadena lateral. Los residuos que se producen naturalmente se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de cadenas laterales:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de cadenas: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

[0193] Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Tales residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o, más preferentemente, en los restantes sitios (no conservados).

[0194] Las variaciones pueden hacerse usando procedimientos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida a sitio), exploración con alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida a sitio [Carter y col., *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller y col., *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)], la mutagénesis por casete [Wells y col., *Gene*, 34:313 (1985)], la mutagénesis con selección de restricción [Wells y col., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden realizarse en el ADN clonado para producir el ADN de la variante de anticuerpo anti-TAT o de polipéptido TAT.

[0195] El análisis de aminoácidos por barrido también pueden emplearse para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos por barrido preferidos están aminoácidos neutros relativamente pequeños. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es normalmente un aminoácido de barrido preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, *Science*, 224:1081-1085 (1989)]. La alanina también se prefiere normalmente porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones enterradas como expuestas (Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no proporciona cantidades adecuadas de variante, puede usarse un aminoácido isotérico.

[0196] Cualquier residuo de cisteína que no participe en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT también puede ser sustituido, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación anómala. En cambio, el (los) enlace(s) de cisteína puede(n) añadirse al anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT para mejorar su estabilidad (particularmente si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

[0197] Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para el desarrollo posterior tendrá(n) propiedades biológicas modificadas mejoradas con respecto al anticuerpo parental del que se generan. Una forma conveniente de generar tales variantes de sustitución implica maduración por afinidad usando expresión en fago. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se maduran para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpos así generadas se expresan de un modo monovalente en partículas de fago filamentoso como fusiones con el producto génico III de M13 encapsidado dentro de cada partícula. Entonces, las variantes expresadas en fago se criban para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Con el fin de identificar sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, puede realizarse mutagénesis por barrido de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el polipéptido TAT humano. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para el posterior desarrollo.

[0198] Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-TAT se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una versión de variante o de no variante anteriormente preparada del anticuerpo anti-TAT.

H. Modificaciones de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT

[0199] Las modificaciones covalentes de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT están incluidas dentro del alcance de la presente invención. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar residuos de aminoácidos elegidos como diana de un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT con un agente derivatizante orgánico que puede reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos del extremo N o C del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su uso en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-TAT, y viceversa. Agentes de reticulación comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluye ésteres de disuccinimidilo tales como propionato de 3,3'-ditiobis(succinimidilo), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como 3-[(p-azidofenil)ditio]propiimidato de metilo.

[0200] Otras modificaciones incluyen desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo para los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de lisina, arginina y cadenas laterales de histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86 (1983)], acetilación de la amina del extremo N y amidación de cualquier grupo carboxilo del extremo C.

[0201] Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT incluida dentro del alcance de la presente invención comprende alterar el patrón de glucosilación nativa del anticuerpo o polipéptido. "Alterar el patrón de glucosilación nativa" está previsto que signifique para los fines en el presente documento delecionar uno o más restos de hidrato de carbono encontrados en el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT de la secuencia nativa (tanto eliminando el sitio de glucosilación subyacente como delecionando la glucosilación por medios químicos y/o enzimáticos) y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT de la secuencia nativa. Además, el término incluye cambios cualitativos en la glucosilación de las proteínas nativas, que implica un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos restos de hidrato de carbono presentes.

[0202] La glucosilación de anticuerpos y otros polipéptidos está normalmente o ligada a N o ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, están en las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, los más comunes serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[0203] La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT original (para sitios de glucosilación ligados a O). La secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT puede alterarse opcionalmente mediante cambios al nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT en bases preseleccionadas de forma que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

[0204] Otro medio de aumentar el número de restos de hidrato de carbono sobre el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT es por acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Tales procedimientos se describen en la materia, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pág. 259-306 (1981).

[0205] La eliminación de restos de hidrato de carbono presentes sobre el anticuerpo anti-TAT o polipéptido

TAT puede llevarse a cabo químicamente o enzimáticamente, o por sustitución mutacional de codones que codifican residuos de aminoácidos que sirven de dianas para la glucosilación. Las técnicas de desglucosilación química se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por Hakimuddin y col., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y por Edge y col., Anal. Biochem., 118:131 (1981). La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono sobre polipéptidos pueden lograrse por el uso de una variedad de endo- y exo-glucosidasas como se describe por Thotakura y col., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

[0206] Otro tipo de modificación covalente de anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT comprende ligar el anticuerpo o polipéptido a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxilalquilenos, en el modo expuesto en las patentes de EE.UU. nº 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.7991.192 ó 4.179.337. El anticuerpo o polipéptido también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A., Ed., (1980).

[0207] El anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT de la presente invención también puede modificarse de forma que se formen moléculas quiméricas que comprenden un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT fusionado con otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos.

[0208] En una realización, una molécula quimérica comprende una fusión del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT a un polipéptido de marca que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo antimarca. La marca de epítipo se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT. La presencia de tales formas marcadas con epítipo del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido de marca. Por tanto, la provisión de la marca de epítipo permite que el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se purifique fácilmente por purificación de afinidad usando un anticuerpo anti-marca u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la marca de epítipo. Diversos polipéptidos de marca y sus anticuerpos respectivos son muy conocidos en la técnica. Ejemplos incluyen marcas de poli-histidina (poli-His) o poli-histidina-glicina (poli-His-Gly); el polipéptido de marca de HA flu y su anticuerpo 12CA5 [Field y col., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; la marca c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para la misma [Evan y col., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; y la marca de glucoproteína D del virus del herpes simple (gD) y su anticuerpo [Paborsky y col., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos de marca incluyen el péptido Flag [Hopp y col., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido del epítipo KT3 [Martin y col., Science, 255:192-194 (1992)]; un péptido del epítipo de α -tubulina [Skinner y col., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; y la marca del péptido de proteína del gen 10 de T7 [Lutz-Freyermuth y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

[0209] En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada una "inmunoadhesina"), una fusión tal podría ser la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana deletado o inactivado) de un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulinas incluye las regiones bisagra, CH₂ y CH₃, o bisagra, CH₁, CH₂ y CH₃ de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas véase también la patente de EE.UU. nº 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

I. Preparación de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT

[0210] La descripción más adelante se refiere principalmente a la producción de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT. Por supuesto, se contempla que pueden emplearse procedimientos alternativos, que son muy conocidos en la técnica, para preparar anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o porciones de la misma, puede producirse por síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida [véanse, por ejemplo, Stewart y col., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteína *in vitro* puede realizarse usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Diversas porciones del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse fusionando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT.

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

[0211] El ADN que codifica anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT puede obtenerse de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree posee el ARNm del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT y lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT humano puede obtenerse convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT también puede obtenerse a partir de una biblioteca genómica o por procedimientos de síntesis conocidos (por ejemplo, síntesis automática de ácidos nucleicos).

[0212] Las bibliotecas pueden cribarse con sondas (tales como oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por él. El cribado del ADNc o la biblioteca genómica con la sonda seleccionada puede realizarse usando procedimientos habituales tal como se describen en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT es usar metodología PCR [Sambrook y col., arriba; Dieffenbach y col., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

[0213] Las técnicas para cribar una biblioteca de ADNc son muy conocidas en la técnica. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser de longitud suficiente y suficientemente inequívocas de forma que se minimicen falsos positivos. El oligonucleótido está preferentemente marcado de forma que pueda detectarse tras la hibridación con ADN en la biblioteca que está cribándose. Los procedimientos de marcado son muy conocidos en la técnica e incluyen el uso de radiomarcas como ATP marcado con ³²P, biotilación o marcado con enzimas. Las condiciones de hibridación, que incluyen rigurosidad moderada y alta rigurosidad, se proporcionan en Sambrook y col., arriba.

[0214] Las secuencias identificadas en tales procedimientos de cribado de bibliotecas pueden compararse y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencias (a tanto el nivel de aminoácidos como de nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia de longitud completa puede determinarse usando procedimientos conocidos en la técnica y como se describen en el presente documento.

[0215] La secuencia que codifica proteínas que tienen ácidos nucleicos puede obtenerse cribando ADNc seleccionado o bibliotecas genómicas usando la secuencia de aminoácidos deducida desvelada en el presente documento por primera vez y, si fuera necesario, usando procedimientos de extensión de cebadores convencionales como se describen en Sambrook y col., arriba, para detectar precursores y productos intermedios de procesamiento de ARNm que pueden no haber sido transcritos de forma inversa en ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

[0216] Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o de clonación descritos en el presente documento para la producción de anticuerpos anti-TAT o polipéptidos TAT y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, pueden ser seleccionadas por el experto sin experimentación adicional. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares pueden encontrarse en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., arriba.

[0217] Los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son conocidos para el experto general, por ejemplo, CaCl₂, CaPO₄, mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas habituales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook y col., arriba, o la electroporación se usan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales como se describe por Shaw y col., *Gene*, 23:315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para células de mamífero sin tales paredes celulares puede emplearse el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Los aspectos generales de las transfecciones del sistema huésped de células de mamífero se han descrito en la patente de EE.UU. n° 4.399.216. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo normalmente según el procedimiento de Van Solingen y col., *J. Bact.*, 130:946 (1977) y Hsiao y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros procedimientos para introducir ADN en células tales como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o

olicaciones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero véanse Keown y col., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) y Mansour y col., *Nature*, 336:348-352 (1988).

5 **[0218]** Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento incluyen células procariotas, de levadura o de eucariotas superiores. Procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a, eubacterias tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están públicamente disponibles tales como la cepa MM294 de *E. coli* K12 (ATCC 31,446); X1776 de *E. coli* (ATCC 31.537); cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27,325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae tales como 10 *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, además de *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41P de *B. licheniformis* desvelada en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes. La cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferido ya que es una cepa 15 huésped común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas para el huésped, incluyendo ejemplos de tales huéspedes la cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA*; cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r*; cepa 37D6 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 20 37D6 con un mutación por delección *degP* resistente a no kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante desvelada en la patente de EE.UU. n° 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de 25 polimerasa de ácido nucleico.

[0219] El anticuerpo de longitud completa, fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpos pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesitan glucosilación y función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el 30 inmunoconjugado muestra por sí mismo eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen mayor semivida en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 5.648.237 (Carter y col.), U.S. 5.789.199 (Joly y col.) y U.S. 5.840.523 (Simmons y col.) que describen la región de iniciación de la traducción (TIR) y secuencias señal para optimizar la expresión y secreción, incorporadas estas 35 patentes en el presente documento por referencia. Después de la expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y puede purificarse mediante, por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final puede llevarse a cabo similar al procedimiento para purificar anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.

40 **[0220]** Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos anti-TAT o polipéptidos TAT. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota inferior comúnmente usado. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); huéspedes de *Kluyveromyces* (patente de EE.UU. n° 4.943.529; Fleeer y col., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y col., *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna y col., *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (documento EP 244.234); 50 *Neurospora crassa* (Case y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991) y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]; Tilburn y col., *Gene*, 26:205-221 [1983]; Yelton y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotróficas son 55 adecuadas en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz de crecer en metanol seleccionada de los géneros que están constituidos por *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específica que son a modo de ejemplo de esta clase de levaduras puede encontrarse en C. Anthony, *The Biochemistry of Methylootrophs*, 269 (1982).

60 **[0221]** Células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT glucosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insecto tales

como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, además de células vegetales tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas víricas para transfección está públicamente disponible, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden usarse como virus en el presente documento según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

10 **[0222]** Sin embargo, el mayor interés ha sido en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de bebés de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-11587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

25 **[0223]** Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos anti-TAT o polipéptidos TAT y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

3. Selección y uso de un vector replicable

30 **[0224]** El anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT que codifica ácidos nucleicos (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) puede insertarse en un vector replicable para clonación (amplificación del ADN) o para expresión. Diversos vectores están públicamente disponibles. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio(s) de endonucleasas de restricción apropiado(s) usando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes de vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación habituales que son conocidas para el experto.

40 **[0225]** TAT puede producirse recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, 1pp o líderes de enterotoxina II estables al calor. Para la secreción de levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de la levadura invertasa, líder del factor alfa (incluyendo líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, este último descrito en la patente de EE.UU. n° 5.010.182), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamífero, las secuencias señal de mamíferos pueden usarse para dirigir la secreción de la proteína, tal como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o relacionadas, además de líderes secretores víricos.

55 **[0226]** Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Tales secuencias son muy conocidas para una variedad de bacterias, levadura y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen de plásmidos 2 μ es adecuado para levadura, y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero.

60 **[0227]** Los vectores de expresión y de clonación contendrán normalmente un gen de selección, también

llamado un marcador de selección. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

[0228] Un ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para recibir el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT tal como DHFR o timidina cinasa. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada como se describe por Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb y col., Nature, 282:39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7:141 (1979); Tschemper y col., Gene, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n° 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

[0229] Los vectores de expresión y de clonación contienen normalmente un promotor operativamente ligado a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos mediante una variedad de posibles células huésped son muy conocidos. Los promotores adecuados para uso con huéspedes procariontes incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang y col., Nature, 275:615 (1978); Goeddel y col., Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); documento EP 36.776] y promotores híbridos tales como el promotor *tac* [deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente ligada al ADN que codifica anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT.

[0230] Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa [Hitzeman y col., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otras enzimas glucolíticas [Hess y col., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)] tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

[0231] Otros promotores de levadura que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por condiciones de crecimiento son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas al metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en el documento EP 73.657.

[0232] La transcripción de anticuerpos anti-TAT o polipéptidos TAT a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus del polioma, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

[0233] La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Sin embargo, normalmente se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia que codifica anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT, pero preferentemente está localizado en un sitio 5' del promotor.

[0234] Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (células de levadura, de hongo, de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de regiones sin traducir en 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc de eucariota o

vírico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT.

[0235] Todavía otros procedimientos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT en cultivo de células de vertebrados recombinantes se describen en Gething y col., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei y col., *Nature*, 281:40-46 (1979); documentos EP 117.060; y EP 117.058.

4. Cultivo de células huésped

[0236] Las células huésped usadas para producir el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT de la presente invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Para cultivar las células huésped son adecuados medios de cultivo comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma). Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes y col., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patentes de EE.UU. n° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Re. 30.985. Cualquiera de estos medios puede complementarse según se necesite con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro componente necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas para aquellos expertos en la materia. Las condiciones de cultivo tales como temperatura, pH y similares son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto general.

5. Detección de la amplificación/expresión de genes

[0237] La amplificación y/o expresión de genes puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferencia por puntos (análisis de ADN) o hibridación *in situ* usando una sonda apropiadamente marcada basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Alternativamente pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos que incluyen dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. A su vez, los anticuerpos pueden estar marcados y el ensayo puede llevarse a cabo cuando el dúplex está unido a una superficie, de manera que tras la formación del dúplex sobre la superficie pueda detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

[0238] Alternativamente, la expresión de genes puede medirse por procedimientos inmunológicos tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales para cuantificar directamente la expresión de producto génico. Anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de muestra pueden ser tanto monoclonales como policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido TAT de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en el presente documento o contra secuencia exógena fusionada a ADN de TAT y que codifique un epítipo de anticuerpo específico.

6. Purificación del anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT

[0239] Las formas de anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT pueden recuperarse a partir de medio de cultivo o de lisados de células huésped. Si está unido a membrana puede desprenderse de la membrana usando una disolución de detergente adecuado (por ejemplo, Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión del anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT pueden romperse por diversos medios físicos o químicos tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o agentes de lisado de células.

[0240] Puede desearse purificar el anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT a partir de proteínas de células recombinantes o polipéptidos. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A-Sepharose para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes de metales para unir formas marcadas con epítopes del anticuerpo anti-TAT y polipéptido TAT. Pueden emplearse diversos procedimientos de purificación de proteínas y tales procedimientos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990) Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*,

Springer-Verlag, Nueva York (1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción usado y del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT particular producido.

[0241] Si se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o directamente secretarse en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, el residuo particulado, tanto células huésped como fragmentos lisados, pueden eliminarse, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter y col., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela pasta de células en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos de células pueden eliminarse por centrifugación. Si el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF puede incluirse en cualquiera de las anteriores etapas para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes fortuitos.

[0242] La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio de Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark y col., *J. Immunol. Methods* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss y col., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que está unida el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno permiten flujos de velocidad más rápida y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que vaya a recuperarse.

[0243] Tras cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes pueden someterse a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, realizado preferentemente a bajas concentraciones de sales (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

J. Formulaciones farmacéuticas

[0244] Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos de unión a TAT, moléculas orgánicas de unión a TAT y/o polipéptidos TAT usados según la presente invención se preparan para almacenamiento mezclando el anticuerpo, polipéptido, oligopéptido o molécula orgánica que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)) en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; tonificantes tales como trehalosa y cloruro sódico; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensioactivo tal como polisorbato; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo comprende preferentemente el anticuerpo a una concentración de entre 5-200 mg/ml, preferentemente entre 10-100 mg/ml.

[0245] Las formulaciones en el presente documento también pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, además de un anticuerpo anti-TAT,

oligopéptido de unión a TAT o molécula orgánica de unión a TAT, puede desearse incluir en la formulación un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-TAT que se une a un epítipo diferente sobre el polipéptido TAT; o un anticuerpo para alguna otra diana tal como un factor de crecimiento que afecta el crecimiento del cáncer particular. Alternativamente o adicionalmente, la composición puede comprender adicionalmente un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

[0246] Los principios activos también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0247] Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo cuyas matrices están en la forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsula. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT[®] (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

[0248] Las formulaciones que van a usarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

K. Diagnóstico y tratamiento con anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos de unión a TAT y moléculas orgánicas de unión a TAT

[0249] Para determinar la expresión de TAT en el cáncer están disponibles diversos ensayos de diagnóstico. En una realización, la expresión en exceso del polipéptido TAT puede analizarse por inmunohistoquímica (IHC). Secciones de tejido incorporadas en parafina de una biopsia de tumor pueden someterse al ensayo de IHC y conferirles un criterio de intensidad de tinción de proteína TAT del siguiente modo:

Puntuación 0 no se observa tinción o se observa tinción de membranas en menos del 10% de las células tumorales.

Puntuación 1 + - se detecta una tinción de membranas leve/apenas perceptible en más del 10% de las células tumorales. Las células sólo están teñidas en parte de su membrana.

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

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

[0250] Aquellos tumores con puntuaciones 0 ó 1+ para la expresión de polipéptidos TAT pueden caracterizarse como que no expresan en exceso TAT, mientras que aquellos tumores con puntuaciones 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que expresan en exceso TAT.

[0251] Alternativamente o adicionalmente pueden llevarse a cabo ensayos de FISH tales como INFORM[®] (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION[®] (Vysis, Illinois) sobre tejido tumoral incorporado en parafina fijado en formalina para determinar el grado (si lo hay) de expresión en exceso de TAT en el tumor.

[0252] La expresión en exceso o amplificación de TAT puede evaluarse usando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo, administrando una molécula (tal como un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica) que se une a la molécula que va a detectarse y que está marcada con una marca detectable (por ejemplo, un isótopo radiactivo o una marca fluorescente) y barriendo externamente el paciente para la localización de la marca.

[0253] Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos y moléculas orgánicas de la invención tienen diversas aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos y moléculas orgánicas de la presente invención pueden ser útiles para diagnosticar y estadificar cánceres que expresan

polipéptido TAT (por ejemplo, en obtención de imágenes por rayos X). Los anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas también son útiles para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptido TAT de células, para la detección y cuantificación de polipéptido TAT *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western, para destruir y eliminar células que expresan TAT de una población de células mixtas como una etapa en la purificación de otras células.

[0254] Actualmente, dependiendo de la fase del cáncer, el tratamiento del cáncer implica una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para eliminar el tejido canceroso, radioterapia y quimioterapia. La terapia con anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica puede ser especialmente deseable en pacientes ancianos que no toleran bien la toxicidad y los efectos secundarios de la quimioterapia y en enfermedad metastásica en la que la radioterapia tiene utilidad limitada. Los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos y moléculas orgánicas que eligen como diana el tumor de la invención son útiles para aliviar cánceres que expresan TAT tras el diagnóstico inicial de la enfermedad o durante la recaída. Para aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica puede usarse solo, o en terapia de combinación con, por ejemplo, hormonas, antiangiogénos o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia. El tratamiento con anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica puede administrarse conjuntamente con otras formas de terapia convencional, tanto consecutivamente con, terapia preconventional como posconventional. Los fármacos quimioterapéuticos tales como TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona se usan en el tratamiento de cáncer, en particular en pacientes con buen riesgo. En el presente procedimiento de la invención para tratar o aliviar cáncer, al paciente con cáncer puede administrarse el anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica junto con el tratamiento con uno o más de los agentes quimioterapéuticos precedentes. En particular se contempla la terapia de combinación con paclitaxel y derivados modificados (véase, por ejemplo, el documento EP0600517). El anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica se administrarán con una dosis terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico. En otra realización, el anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica se administra conjuntamente con quimioterapia para potenciar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. El vademécum (PDR) desvela dosificaciones de estos agentes que se han usado en el tratamiento de diversos cánceres. Las pautas de dosificación y las dosificaciones de estos fármacos quimioterapéuticos anteriormente mencionados que son terapéuticamente eficaces dependerán del cáncer particular que está tratándose, el grado de la enfermedad y otros factores familiares para el médico experto en la materia y pueden determinarse por el médico.

[0255] En una realización particular, un conjugado que comprende un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica conjugado con un agente citotóxico se administra al paciente. Preferentemente, el inmunoconjugado unido a la proteína TAT es internalizado por la célula, produciendo un aumento de la eficacia terapéutica del inmunoconjugado en la destrucción de la célula cancerosa con la que se une. En una realización preferida, el agente citotóxico elige como diana o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Ejemplos de tales agentes citotóxicos se describen anteriormente e incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

[0256] Los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos, moléculas orgánicas o conjugados de toxina de los mismos se administran a un paciente humano según procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica.

[0257] Otras pautas terapéuticas pueden combinarse con la administración del anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica. La administración combinada incluye co-administración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferentemente hay un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos los) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferentemente, tal terapia combinada produce un efecto terapéutico sinérgico.

[0258] También puede desearse combinar la administración del anticuerpo o anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos o moléculas orgánicas con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno de tumor asociado al cáncer particular.

[0259] En otra realización, los procedimientos de tratamiento terapéutico de la presente invención implican la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos) anti-TAT, oligopéptidos o moléculas orgánicas y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, que incluyen la co-administración de mezclas de diferentes agentes quimioterapéuticos. Agentes quimioterapéuticos incluyen antibióticos de fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalan, ciclofosfamida, hidroxurea e hidroxureataxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antraciclina. La preparación y los programas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse según instrucciones del fabricante o como se determina empíricamente

por el médico experto. La preparación y los programas de dosificación para tal quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

5 **[0260]** El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica puede combinarse con un compuesto antihormonal; por ejemplo, un compuesto antiestrogénico tal como tamoxifeno; una antiprogesterona tal como onapristona (véase el documento EP 616 812); o un antiandrógeno tal como flutamida, en dosificaciones conocidas para tales moléculas. Si el cáncer que va a tratarse es cáncer independiente de andrógenos, el paciente puede haberse sometido previamente a terapia antiandrogénica y, después de que el cáncer se convierta en independiente de andrógenos, el anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica (y opcionalmente otros agentes como se describen en el presente documento) puede administrarse al paciente.

15 **[0261]** Algunas veces también puede ser beneficioso co-administrar un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada a la terapia) o una o más citocinas al paciente. Además de la pautas terapéuticas anteriores, el paciente puede someterse a extirpación quirúrgica de células cancerosas y/o radioterapia antes, simultáneamente con o después de la terapia con anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica. Dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes anteriormente co-administrados son aquellas presentemente usadas y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica.

20 **[0262]** Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosificación y el modo de administración se elegirán por el médico según criterios conocidos. La dosificación apropiada de anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, como se define anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica, y la discreción del médico adjunto. El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Preferentemente, el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se administra por infusión intravenosa o por inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, aproximadamente 0,1-15 mg/kg/dosis) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto si es, por ejemplo, por una o más administraciones separadas como si es por infusión continua. Una pauta de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-TAT. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. El progreso de esta terapia puede monitorizarse fácilmente mediante procedimientos y ensayos convencionales y basándose en criterios conocidos para el médico u otros expertos en la materia.

40 **[0263]** Aparte de la administración de la proteína de anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo por terapia génica. Tal administración de ácido nucleico que codifica el anticuerpo está englobada por la expresión "administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo". Véase, por ejemplo, el documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996 referente al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

45 **[0264]** Hay dos enfoques principales para entrar el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, normalmente en el sitio en el que se requiere el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, las células del paciente se extraen, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente tanto directamente como, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que son implantadas en el paciente (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.892.538 y 5.283.187). Hay una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del huésped previsto. Técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión de células, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector comúnmente usado para la administración *ex vivo* del gen es un vector retrovírico.

60 **[0265]** Las técnicas de transferencia de ácido nucleico *in vivo* actualmente preferidas incluyen transfección con vector vírico (tal como adenovirus, virus del herpes simple I o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol). Para la revisión de los protocolos de marcado y de terapia génica actualmente conocidos véase Anderson y col.,

Science 256:808-813 (1992). Véase también el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en su interior.

5 [0266] Los anticuerpos anti-TAT de la invención puede estar en las diferentes formas englobadas por la definición de "anticuerpo" en el presente documento. Por tanto, los anticuerpos incluyen anticuerpo de longitud completa o intacto, fragmentos de anticuerpos, anticuerpo de secuencia nativa o variantes de aminoácidos, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, inmunconjugados, y fragmentos funcionales de los mismos. En los anticuerpos de fusión, una secuencia de anticuerpos está fusionada con una secuencia de polipéptidos heteróloga. Los anticuerpos pueden modificarse en la región Fc para proporcionar funciones efectoras deseadas. Como se trata en más detalle en las secciones en el presente documento, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido sobre la superficie celular puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o por reclutamiento de complemento en citotoxicidad dependiente del complemento, o algún otro mecanismo. Alternativamente, si se desea eliminar o reducir la función efectora, de forma que se minimicen los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas, pueden usarse ciertas otras regiones Fc.

15 [0267] En una realización, el anticuerpo compite por la unión a, o se une sustancialmente a, el mismo epítoto que los anticuerpos de la invención. También se contemplan anticuerpos que tienen las características biológicas de los presentes anticuerpos anti-TAT de la invención, que incluyen específicamente la elección de tumor como diana *in vivo* y cualquier inhibición de la proliferación celular o características citotóxicas.

20 [0268] Los procedimientos de producción de anticuerpos anteriores se describen en detalle en el presente documento.

25 [0269] Los presentes anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos y moléculas orgánicas son útiles para tratar un cáncer que expresa TAT o que alivia uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Un cáncer tal incluye cáncer de próstata, cáncer de las vías urinarias, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de ovario, más específicamente adenocarcinoma de próstata, carcinomas de células renales, adenocarcinomas colorrectales, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas de células escamosas de pulmón y mesotelioma pleural. Los cánceres engloban cánceres metastásicos de cualquiera de los precedentes. El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica puede unirse a al menos una parte de las células cancerosas que expresan polipéptido TAT en el mamífero. En una realización preferida, el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica es eficaz para destruir o matar células tumorales que expresan TAT o inhiben el crecimiento de tales células tumorales, *in vitro* o *in vivo*, tras la unión al polipéptido TAT sobre la célula. Un anticuerpo tal incluye un anticuerpo anti-TAT desnudo (no conjugado con ningún agente). Anticuerpos desnudos que tienen propiedades citotóxicas o de inhibición del crecimiento celular pueden aprovecharse adicionalmente con un agente citotóxico para hacerlos incluso más potentes en la destrucción de células tumorales. Las propiedades citotóxicas pueden conferirse a un anticuerpo anti-TAT, por ejemplo, conjugando el anticuerpo con un agente citotóxico para formar un inmunconjugado como se describe en el presente documento. El agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento es preferentemente una molécula pequeña. Se prefieren toxinas tales como caliqueamicina o un maitansinoide, y análogos o derivados de los mismos.

40 [0270] La invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica de la invención, y un vehículo. Para los fines para tratar cáncer, las composiciones pueden administrarse al paciente en necesidad de tal tratamiento, en el que la composición puede comprender uno o más anticuerpos anti-TAT presentes como inmunconjugado o como el anticuerpo desnudo. En otra realización, las composiciones puede comprender estos anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas en combinación con otros agentes terapéuticos tales como agentes citotóxicos o inhibidores del crecimiento, que incluyen agentes quimioterapéuticos. La invención también proporciona formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica de la invención, y un vehículo. En una realización, la formulación es una formulación terapéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 [0271] Otro aspecto de la invención es ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-TAT. Están englobados ácidos nucleicos que codifican tanto las cadenas H como L, y especialmente los residuos de la región hipervariable, cadenas que codifican el anticuerpo de la secuencia nativa, además de variantes, modificaciones y versiones humanizadas del anticuerpo.

55 [0272] La invención también proporciona procedimientos útiles para tratar un cáncer que expresa polipéptido TAT o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica al mamífero. Las composiciones terapéuticas de anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica pueden administrarse a corto plazo (aguda) o crónica, o intermitentemente como sea indicado por el médico. También se proporcionan procedimientos para inhibir el crecimiento de y destruir una célula que expresa polipéptido TAT.

60

[0273] La invención también proporciona kits y artículos de fabricación que comprenden al menos un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica. Los kits que contienen anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos o moléculas orgánicas se usan, por ejemplo, para ensayos de destrucción de células de TAT, para la purificación o inmunoprecipitación del polipéptido TAT de células, Por ejemplo, para el aislamiento y la purificación de TAT, el kit puede contener un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica acoplada a perlas (por ejemplo, perlas de Sepharose). Pueden proporcionarse kits que contienen los anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas para la detección y cuantificación de TAT *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Tal anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica útil para la detección puede proporcionarse con una marca tal como una marca fluorescente o radiomarca.

L. Artículos de fabricación y kits

[0274] Otra realización de la invención es un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de cáncer que expresa anti-TAT. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección por cáncer y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar cáncer. La etiqueta o prospecto comprenderá además instrucciones para administrar la composición de anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica al paciente con cáncer. Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

[0275] También se proporcionan kits que son útiles para diversos fines, por ejemplo, para ensayos de destrucción de células que expresan TAT, para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptido TAT de células. Para el aislamiento y la purificación de polipéptido TAT, el kit puede contener un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica acoplado a perlas (por ejemplo, perlas de Sepharose). Pueden proporcionarse kits que contienen los anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas para la detección y cuantificación del polipéptido TAT *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Al igual que con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido o molécula orgánica de la invención. Pueden incluirse recipientes adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La marca o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición, además de instrucciones para el uso *in vitro* o de diagnóstico previsto.

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

[0276] Las secuencias de nucleótidos (o su complemento) que codifican polipéptidos TAT tienen diversas aplicaciones en la ciencia de la biología molecular, que incluyen usos como sondas de hibridación, en el mapeo de cromosomas y de genes y en la generación de ARN antisentido y sondas de ADN. El ácido nucleico que codifica TAT también será útil para la preparación de polipéptidos TAT por las técnicas recombinantes descritas en el presente documento, en las que aquellos polipéptidos TAT pueden usarse, por ejemplo, en la preparación de anticuerpos anti-TAT como se describe en el presente documento.

[0277] El gen TAT de la secuencia nativa de longitud completa, o porciones del mismo, puede usarse como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el ADNc de TAT de longitud completa o para aislar otros ADNc más (por ejemplo, aquellos que codifican variantes de TAT que se producen naturalmente o TAT de otras especies) que tienen una identidad de secuencias deseada con la secuencia de TAT nativa desvelada en el presente documento. Opcionalmente, la longitud de las sondas será aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivarse de regiones al menos parcialmente novedosas de la secuencia de nucleótidos nativa de longitud completa en las que aquellas regiones pueden determinarse sin experimentación adicional o a partir de secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos potenciadores e intrones de TAT de la secuencia nativa. A modo de ejemplo, un procedimiento de cribado comprenderá aislar la región codificante del gen TAT usando la secuencia de ADN conocida por sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación pueden marcarse mediante una variedad de marcas, que incluyen radionucleótidos tales como ³²P o ³⁵S, o marcas enzimáticas tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda por sistemas de acoplamiento de avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la del gen TAT de la presente invención pueden usarse para cribar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o

ARNm para determinar con qué miembros de tales bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen en más detalle en los ejemplos más adelante. Cualquier secuencia EST desvelada en la presente solicitud puede emplearse similarmente como sondas, usando los procedimientos desvelados en el presente documento.

5 **[0278]** Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos que codifican TAT incluyen oligonucleótidos antisentido o sentido que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos monocatenaria (tanto ARN como ADN) que puede unirse a secuencias diana de ARNm de TAT (sentido) o de ADN de TAT (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o sentido, según la presente invención, comprenden un fragmento de la región codificante de ADN de TAT. Un fragmento tal generalmente comprende al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 14 a 30 nucleótidos. La capacidad para derivar un oligonucleótido antisentido o uno sentido, basándose en una secuencia de ADNc que codifica una proteína dada, se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (Cancer Res, 48:2659, 1988) y van der Krol y col. (BioTechniques 6:958, 1988).

15 **[0279]** La unión de oligonucleótidos antisentido o sentido a secuencias de ácidos nucleicos diana produce la formación de dúplex que bloquean la transcripción o traducción de la secuencia diana por uno de varios medios, que incluyen degradación potenciada de los dúplex, terminación prematura de la transcripción o traducción, o por otros medios. Tales procedimientos están englobados por la presente invención. Por tanto, los oligonucleótidos antisentido pueden usarse para bloquear la expresión de proteínas TAT, en los que aquellas proteínas TAT pueden desempeñar una función en la inducción de cáncer en mamíferos. Los oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden además oligonucleótidos que tienen esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otros enlaces con el azúcar, tales como aquellos descritos en el documento WO 91/06629) y en los que tales enlaces con el azúcar son resistentes a nucleasas endógenas. Tales oligonucleótidos con enlaces de azúcar resistentes son estables *in vivo* (es decir, pueden resistir a la degradación enzimática), pero retienen la especificidad de secuencias para poder unirse a secuencias de nucleótidos diana.

25 **[0280]** Sitios intragénicos preferidos para la unión antisentido incluyen la región que incorpora la iniciación de la traducción/codón de iniciación (5'-AUG/5'-ATG) o terminaciones/codón de terminación (5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA/5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA) del marco de lectura abierto (ORF) del gen. Estas regiones se refieren a una parte del ARNm o gen que engloban de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' ó 3') desde una iniciación de la traducción o codón de terminación. Otras regiones preferidas para la unión antisentido incluyen: intrones; exones; unión de intrón-exón; el marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que es la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación antisentido; la tapa de 5' de un ARNm que comprende un residuo de guanosina metilado en N7 unido al residuo más hacia 5' del ARNm por un enlace trifosfato 5-5' e incluye la propia estructura de tapa 5', además de los 50 primeros nucleótidos adyacentes a la tapa; la región sin traducir de 5' (5'UTR), la porción de un ARNm en la dirección 5' del codón de iniciación de la traducción y que, por tanto, incluye nucleótidos entre el sitio de tapa de 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm o nucleótidos correspondientes sobre el gen; y la región sin traducir de 3' (3'UTR), la porción de un ARNm en la dirección 3' del codón de terminación de la traducción y que, por tanto, incluye nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm o nucleótidos correspondientes sobre el gen.

45 **[0281]** Ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos útiles para inhibir la expresión de proteínas TAT incluyen oligonucleótidos que contienen esqueletos modificados o enlaces internucleosídicos no naturales. Oligonucleótidos que tienen esqueletos modificados incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en el esqueleto y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los fines de esta memoria descriptiva, y como algunas veces se menciona en la materia, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto de internucleósidos también pueden considerarse que son oligonucleósidos. Esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilos que incluyen fosfonatos de 3'-alquileo, fosfonatos de 5'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y borano-fosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos ligados en 2'-5' de estos, y aquellos que tiene polaridad invertida en los que uno o más enlaces internucleosídicos es un enlace 3' a 3', 5' a 5' ó 2' a 2'. Oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden un único enlace 3' a 3' en el enlace internucleosídico más hacia 3', es decir, un único residuo de nucleósido invertido que puede ser abásico (falta la nucleobase o tiene un grupo hidroxilo en su lugar). También están incluidas diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de enlaces que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. n°: 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.189.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.194.599; 5.565.555; 5.527.899; 5.721.218; 5.672.697 y 5.625.050.

[0282] Esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en su interior tienen esqueletos que se forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo mixtos, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Éstos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilformacetilo y tioformacetilo; esqueletos de riboacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metiliminino y metilhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂ mixtos. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales oligonucleósidos incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. n°: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439.

[0283] En otros oligonucleótidos antisentido preferidos, tanto el enlace con el azúcar como el internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótidos se reemplazan por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Un compuesto oligomérico tal, un mimético de oligonucleótidos que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción de amida del esqueleto. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. n°: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Otra enseñanza de compuestos de PNA puede encontrarse en Nielsen y col., Science, 1991, 254, 1497-1500.

[0284] Oligonucleótidos antisentido preferidos incorporan esqueletos de fosforotioato y/o esqueletos de heteroátomos, y en particular CH₂NH-O-CH₂-, CH₂-N(CH₃)-O-CH₂ [conocido como esqueleto de metileno(metilimino) o MMI], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₃- [en el que el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como -O-P-O-CH₂-] descritos en la patente de EE.UU. n° 5.489.677 anteriormente citada y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. n° 5.602.240 anteriormente citada. También se prefieren oligonucleótidos antisentido que tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la patente de EE.UU. n° 5.034.506 anteriormente citada.

[0285] Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-alquilo, S-alquilo, o N-alquilo; O-alqueno, S-alqueno o N-alqueno; O-alquino, S-alquino o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno C₂ a C₁₀ y alquino sustituido o sin sustituir. Particularmente se prefieren O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂ en las que n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos antisentido preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo C₁ a C₁₀ inferior, alquilo inferior sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, OHO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sillio sustituido, un grupo saliente de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y col., Helv. Chim. Acta 78:486-504), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferida incluye 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.

[0286] Otra modificación preferida incluye ácidos nucleicos bloqueados (LNA) en los que el grupo 2'-hidroxilo está ligado al átomo de carbono de 3' ó 4' del anillo de azúcar formando así un resto de azúcar bicíclico. El enlace es preferentemente un grupo metileno (-CH₂-)_n que une por puentes el átomo de oxígeno de 2' y el átomo de carbono de 4' en el que n es 1 ó 2. Los LNA y la preparación de los mismos se describe en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

[0287] Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂-NH₂), 2'-alilo (2-CH₂-CH-CH₂), 2'-O-alilo (2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-flúor (2'-F). La modificación en 2' puede ser en la posición arábico (arriba) o la posición ribo (abajo). Una modificación en 2'-arábico preferida es 2'-F. También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos ligados en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los

oligonucleótidos también pueden tener miméticos del azúcar tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. n°: 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.591.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.813; 5.670.633; 5.792.747; y 5.700.920.

[0288] Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la materia simplemente "base"). Como se usa en el presente documento, nucleobases "sin modificar" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil (-C≡C-CH₃ o -CH₂-C≡CH) uracilo y citosina y otros derivados de alquilo de bases de pirimidina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Otras nucleobases modificadas incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina (1H-pirimido[3,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), abrazaderas de G tales como una fenoxazina citidina sustituida (por ejemplo 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[3,4-b][1,4]benzoxasin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindolecitidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina se reemplaza por otros heterociclos, por ejemplo, 7-deazaadenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otras nucleobases incluyen las desveladas en la patente de EE.UU. n° 3.687.808, las desveladas en *The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering*, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I, ed. John Wiley & Sons; 1990, y las desveladas por Englisch y col., *Angewandte Chemie*, edición internacional, 1991, 30, 613. Ciertas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Éstas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 3-propinilcitosina, se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 0,6-1,2°C (Sanghvi y col., *Antisense Research and Applications*, CRC Press. Boca Raton, 1993, pág. 276-278) y se prefieren sustituciones de bases, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil-azúcar. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a: la patente de EE.UU. n° 3.687.808, además de las patentes de EE.UU. n°: 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 3.302.177; 5.325.711; 5.552.540; 5.581.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; 5.681.941 y 5.750.692.

[0289] Otra modificación de oligonucleótidos antisentido ligar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención pueden incluir grupos conjugados covalentemente unidos a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, lípidos catiónicos, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de la presente invención, incluyen grupos que mejoran la captación de oligómeros, potencian la resistencia de oligómeros a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencias con ARN. Grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente invención, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o secreción de oligómeros. Restos de conjugado incluyen, pero no se limitan a, restos de lípidos tales como un resto de colesterol (Letsinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6533-6556), ácido cólico (Manoharan y col., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitol (Manoharan y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan y col., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser y col., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras y col., *EMBO J.*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov y col., *FEDS Lett.*, 1990, 159, 327-330; Svinarchuk y col., *Biochimie*, 1993, 73, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietil-amonio (Manoharan y col., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3631-3634; Shea y col., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783), una cadena de poliamina o de polietilenglicol (Manoharan y col., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 969-973) o ácido adamantanoacético (Manoharan y col., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654), un resto palmitilo (Mishra y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237), o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la invención también pueden conjugarse con principios

activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoptofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbitúrico, una cefalosporina, una sulfamida, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Conjugados de oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 09/334.130 (presentada el 15 de junio de 1999) y las patentes de Estados Unidos nº: 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.333; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 3.112.963; 5.214.136; 5.243.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 3.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 3.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 3.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.352; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.397.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

[0290] No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado estén uniformemente modificadas y, de hecho, más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas puede incorporarse en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente invención también incluye compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Los compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras" en el contexto de la presente invención son compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, representando cada una al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótido. Estos oligonucleótidos normalmente contienen al menos una región en la que el oligonucleótido se modifica de manera que se confiera al oligonucleótido un aumento de la resistencia a la degradación por nucleasas, aumento de la captación celular y/o aumento de la afinidad de unión para el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir de sustrato para enzimas que pueden escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. Por tanto, la activación de RNasa H produce la escisión de la ARN diana, potenciándose así enormemente la eficiencia de la inhibición de oligonucleótidos de la expresión génica. Por consiguiente, frecuentemente pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos en comparación con desoxi oligonucleótidos de fosforotioato que se hibridan con la misma región diana. Los compuestos antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos como se ha descrito anteriormente. Oligonucleótidos antisentido quiméricos preferidos incorporan al menos un azúcar modificado en 2' (preferentemente 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3' para conferir resistencia a nucleasa y una región con al menos 4 azúcares en 2'-H contiguos para conferir actividad de RNasa H. Tales compuestos también se han denominado en la materia híbridos o gámpmeros. Los gámpmeros preferidos tienen una región de azúcares modificados en 2' (preferentemente 2'-O-(CH₂)₂-CH₃) en el extremo 3' y en el extremo 5' separada por al menos una región que tiene al menos 4 azúcares en 2'-H contiguos y preferentemente incorporan enlaces de esqueleto fosforotioato. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.335; 5.652.356; y 5.700.922.

[0291] Los compuestos antisentido usados según la presente invención puede prepararse convenientemente y rutinariamente por la técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para tal síntesis es comercializado por varios vendedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Cualquier otro medio para tales síntesis conocidas puede emplearse adicionalmente o alternativamente. Es muy conocido usar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. Los compuestos de la invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos como, por ejemplo, liposomas, moléculas elegidas como diana por el receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales formulaciones que ayudan en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 3.439.127; 5.311.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.334.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.393.619; 5.416.016; 3.417.978; 3.462.834; 5.469.854; 5.512.295; 5.327.528; 3.334.239; 3.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

[0292] Otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido incluyen aquellos oligonucleótidos que están ligados covalentemente a restos orgánicos tales como aquellos descritos en el documento WO 90/10049, y otros restos que aumentan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácidos nucleicos diana, tal como poli-(L-lisina). Todavía más, agentes intercalantes, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos pueden unirse a oligonucleótidos sentido o antisentido para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido antisentido o sentido por la secuencia de nucleótidos diana.

[0293] Los oligonucleótidos antisentido o sentido pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia

de ácidos nucleicos diana por cualquier procedimiento de transferencia génica que incluye, por ejemplo, transfección de ADN mediada por CaPO_4 , electroporación, o usando vectores de transferencia génica tales como virus de Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, un oligonucleótido antisentido o sentido se inserta en un vector retrovítico adecuado. Una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana se pone en contacto con el vector retrovítico recombinante, tanto *in vivo* como *ex vivo*. Vectores retrovíticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados del retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de doble copia designados DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase el documento WO 90/13641).

[0294] Los oligonucleótidos sentido o antisentido también pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana por formación de un conjugado con una molécula de unión a ligando, como se describe en el documento WO 91/04753. Moléculas de unión a ligando adecuadas incluyen, pero no se limitan a, receptor de la superficie celular, factores de crecimiento, otras citocinas, u otros ligandos que se unen a receptores de la superficie celular. Preferentemente, la conjugación de la molécula de unión a ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión a ligando para unirse a su molécula o receptor correspondiente o bloquear la entrada del oligonucleótido sentido u antisentido o su versión conjugada en la célula.

[0295] Alternativamente, un oligonucleótido sentido o antisentido puede introducirse en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana por formación de un complejo de oligonucleótido-lípido, como se describe en el documento WO 90/10448. El complejo de oligonucleótido sentido o antisentido-lípido se disocia preferentemente dentro de la célula por una lipasa endógena.

[0296] Las moléculas de ARN o ADN antisentido o sentido tienen generalmente al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 153, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 190, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 ó 1000 nucleótidos de longitud, en las que en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de secuencia de nucleótidos mencionada más o menos el 10% de esa longitud mencionada.

[0297] Las sondas también pueden emplearse en técnicas de PCR para generar un conjunto de secuencias para la identificación de secuencias codificantes de TAT estrechamente relacionadas.

[0298] Las secuencias de nucleótidos que codifican TAT también pueden usarse para la construcción de sondas de hibridación para mapear el gen que codifica TAT y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en el presente documento pueden mapearse con un cromosoma y regiones específicas de un cromosoma usando técnicas conocidas, tales como hibridación *in situ*, análisis de enlaces contra marcadores cromosómicos conocidos y cribado de hibridación con bibliotecas.

[0299] Si las secuencias codificantes para TAT codifican una proteína que se une a otra proteína (ejemplo, si TAT es un receptor), TAT puede usarse en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas que participan en la interacción de unión. Por tales procedimientos pueden identificarse los inhibidores de la interacción de unión a receptor/ligando. Las proteínas que participan en tales interacciones de unión también pueden usarse para cribar inhibidores o agonistas de péptidos o moléculas pequeñas de la interacción de unión. Por tanto, el receptor para TAT puede usarse para aislar ligando(s) correlativo(s). Pueden diseñarse ensayos de cribado para encontrar compuestos cabeza de serie que imitan la actividad biológica de un TAT nativo o un receptor para TAT. Tales ensayos de cribado incluirán ensayos aceptados para cribados de alto rendimiento de bibliotecas químicas, que hacen que sean particularmente adecuados para identificar candidatos de fármacos de moléculas pequeñas. Moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, que incluyen ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están todos bien caracterizados en la materia.

[0300] También pueden usarse ácidos nucleicos que codifican TAT o sus formas modificadas para generar tanto animales transgénicos como animales de "genes inactivados" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y el cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, transgén que se introdujo en el animal o un antecesor del animal en un estado prenatal, por ejemplo, embrionario. Un transgén es un ADN que está integrado en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADNc que codifica TAT puede usarse para clonar ADN genómico que codifica TAT según técnicas establecidas y las secuencias genómicas usadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica TAT. Los procedimientos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la materia y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 4.736.866 y 4.870.009.

Normalmente, células particulares serían elegidas como diana para la incorporación del transgén de TAT con potenciadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica TAT introducido en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria pueden usarse para examinar el efecto del aumento de la expresión de ADN que codifica TAT. Tales animales pueden usarse como animales de prueba para reactivos debido a que se cree que confieren protección de, por ejemplo, afecciones patológicas asociadas a su expresión en exceso. Según esta faceta de la invención, un animal se trata con el reactivo y una incidencia reducida de la afección patológica, en comparación con animales sin tratar que llevan el transgén, indicaría una posible intervención terapéutica para la afección patológica.

[0301] Alternativamente, homólogos no humanos de TAT pueden usarse para la construcción de un animal de TAT "inactivado" que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica TAT como resultado de recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica TAT y ADN genómico alterado que codifica TAT introducido en un citoblasto embrionario del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica TAT puede usarse para clonar ADN genómico que codifica TAT según técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica TAT puede delecionarse o sustituirse con otro gen, tal como un gen que codifica un marcador de selección que puede usarse para monitorizar la integración. Normalmente, varios kilobases de ADN flanqueante sin alterar (tanto en los extremos 5' como 3') están incluidos en el vector [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos]. El vector se introduce en una línea de citoblastos embrionarios (por ejemplo, por electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno [véase, por ejemplo, Li y col., Cell, 69:915 (1992)]. Entonces, las células seleccionadas se inyectan en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o rata) para formar quimeras de agregación [véase, por ejemplo, Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pág. 113-152]. Un embrión quimérico puede luego implantarse en un animal adoptivo hembra pseudoembarazado adecuado y el embrión llevarse a término para crear un animal "de genes inactivados". La progenie que alberga el ADN homológamente recombinado en sus células germinales puede identificarse por técnicas convencionales y usarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN homológamente recombinado. Los animales de genes inactivados pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad para defenderse contra ciertas afecciones patológicas y por su desarrollo de afecciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido TAT.

[0302] El ácido nucleico que codifica los polipéptidos TAT también puede usarse en terapia génica. En aplicaciones de terapia génica, los genes se introducen en células con el fin de lograr la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la sustitución de un gen defectuoso. "Terapia génica" incluye tanto terapia génica convencional en la que se logra un efecto duradero por un único tratamiento como la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración de una sola vez o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Los ARN y ADN antisentido pueden usarse como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. Ya se ha mostrado que los oligonucleótidos antisentido cortos pueden importarse en células cuando actúan de inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares producidas por su captación limitada por la membrana celular (Zamecnik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos pueden modificarse para potenciar su captación, por ejemplo, sustituyendo sus grupos fosfodiéster negativamente cargados por grupos sin cargar.

[0303] Hay una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del huésped previsto. Técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión de células, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio, etc. Las técnicas de transferencia de genes *in vivo* actualmente preferidas incluyen transfección con vectores víricos (normalmente retrovíricos) y transfección mediada por proteína-liposoma de la envoltura vírica (Dzau y col., Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones se desea proveer la fuente de ácido nucleico de un agente que elige como diana las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor sobre la célula diana, etc. Si se emplean liposomas pueden usarse proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada a endocitosis para la elección de diana y/o para facilitar la captación, por ejemplo, de proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas tróficas para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que se someten a internalización en el ciclo, proteínas que eligen como diana la totalización intracelular y potencian la semivida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, por Wu y col., J Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); y Wagnery col., Proc., Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). Para una revisión del mercado de genes y protocolos de terapia génica véase Anderson y col., Science 256, 808-813 (1992).

[0304] Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos TAT o fragmentos de los mismos descritos en el presente documento son útiles para la identificación de cromosomas. A este respecto, existe una

necesidad continua de identificar nuevos marcadores de cromosomas, ya que actualmente están disponibles relativamente pocos reactivos de marcado de cromosomas, basados en los datos de secuencias reales. Cada molécula de ácido nucleico de TAT de la presente invención puede usarse como marcador de cromosoma.

5 **[0305]** Los polipéptidos TAT y moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención también pueden usarse diagnósticamente para el tipado de tejidos, en el que los polipéptidos TAT de la presente invención pueden expresarse diferencialmente en un tejido con respecto a otro, preferentemente en un tejido enfermo con respecto a un tejido normal del mismo tipo de tejido. Las moléculas de ácidos nucleicos de TAT se usarán para generar sondas para PCR, análisis de Northern, análisis de Southern y análisis de Western.

10 **[0306]** La presente invención engloba procedimientos de cribado de compuestos para identificar aquellos que imitan al polipéptido TAT (agonistas) o previenen el efecto del polipéptido TAT (antagonistas). Los ensayos de cribado para candidatos de fármacos antagonistas se diseñan para identificar compuestos que se unen o se complejan con los polipéptidos TAT codificados por los genes identificados en el presente documento, o de otro modo interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares que incluyen, por ejemplo, inhibir la expresión de polipéptido TAT de células. Tales ensayos de cribado incluirán ensayos aceptados para cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, que hacen que sean particularmente adecuados para identificar candidatos de fármacos de moléculas pequeñas.

20 **[0307]** Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, que incluyen ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están todos bien caracterizados en la materia.

25 **[0308]** Todos los ensayos para antagonistas tienen en común que requieren poner en contacto el candidato a fármaco con un polipéptido TAT codificado por un ácido nucleico identificado en el presente documento en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

30 **[0309]** En ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido TAT codificado por el gen identificado en el presente documento o el candidato a fármaco se inmoviliza sobre una fase sólida, por ejemplo, sobre una placa de microtitulación, por uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente se lleva generalmente a cabo por recubrimiento de la superficie sólida con una disolución del polipéptido TAT y secado. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido TAT que va a inmovilizarse puede usarse para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede marcarse por una marca detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción está completa, los componentes no reaccionados se eliminan, por ejemplo, lavando y se detectan los complejos anclados sobre la superficie sólida. Cuando el componente no inmovilizado originariamente lleva una marca detectable, la detección de la marca inmovilizada sobre la superficie indica que se ha producido el complejamiento. Cuando el componente originariamente no inmovilizado no lleva una marca, la complejación puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado específicamente que se une al complejo inmovilizado.

45 **[0310]** Si el compuesto candidato interactúa, pero no se une a un polipéptido TAT particular codificado por un gen identificado en el presente documento, su interacción con ese polipéptido puede ensayarse mediante procedimientos muy conocidos para detectar las interacciones proteína-proteína. Tales ensayos incluyen enfoques tradicionales tales como, por ejemplo, reticulación, coimmunoprecipitación y co-purificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden monitorizarse usando un sistema genético basado en levadura descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, Nature (Londres), 340:245-246 (1989); Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)) como se desvela por Chevray y Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como levadura GAIA, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, actuando uno de dominio de unión a ADN, funcionando el otro de dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levadura descrito en las publicaciones anteriores (generalmente denominado el "sistema de dos híbridos") aprovecha esta propiedad y emplea dos proteínas híbridas, una en la que proteína diana está fusionada con el dominio de unión a ADN de GAIA y la otra en la que las proteínas activadoras candidatas están fusionadas con el dominio de activación. La expresión de un gen indicador GAIA-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAIA depende de la reconstitución de la actividad de GAIA por interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos interactuantes se detectan con un sustrato cromogénico para β -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de dos híbridos está comercialmente disponible de Clontech. Este sistema también puede extenderse para mapear los dominios de proteínas que participan en las interacciones de proteínas específicas, además de para localizar residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

[0311] Compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido TAT identificado en el presente documento y otros componentes intra- o extracelulares pueden probarse del siguiente modo: normalmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra- o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permitan la interacción y unión de los dos productos. Para probar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se ejecuta en ausencia y en presencia del compuesto de prueba. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción, para servir de control positivo. La unión (formación de complejos) entre el compuesto de prueba y el componente intra- o extracelular presente en la mezcla se monitoriza como se ha descrito anteriormente en el presente documento. La formación de un complejo en la(s) reacción (reacciones) de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de prueba, indica que el compuesto de prueba interfiere con la interacción del compuesto de prueba y su componente de reacción.

[0312] Para ensayar antagonistas, el polipéptido TAT puede añadirse a una célula junto con el compuesto que va a cribarse para una actividad particular y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido TAT indica que el compuesto es un antagonista para el polipéptido TAT. Alternativamente, los antagonistas pueden detectarse combinando el polipéptido TAT y un posible antagonista con receptores del polipéptido TAT o receptores recombinantes unidos a la membrana bajo condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido TAT puede marcarse, tal como por radiactividad, de forma que el número de moléculas de polipéptido TAT unidas al receptor puede usarse para determinar la eficacia del posible antagonista. El gen que codifica el receptor puede identificarse por numerosos procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, inmunopurificación de ligandos y clasificación por FACS. Coligan y col., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): Capítulo 5 (1991). Preferentemente se emplea la clonación de la expresión en la que el ARN poliadenilado se prepara a partir de una célula sensible al polipéptido TAT y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en conjuntos y se usa para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido TAT. Las células transfectadas que se cultivan sobre portaobjetos de vidrio se exponen al polipéptido TAT marcado. El polipéptido TAT puede marcarse mediante una variedad de medios que incluyen yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína cinasa específica para sitio. Tras la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a análisis autorradiográfico. Se identifican conjuntos positivos y se preparan subconjuntos y se re-transfectan usando un procedimiento de sub-agrupamiento y re-cribado interactivo, dando eventualmente un único clon que codifica el receptor putativo.

[0313] Como un enfoque alternativo para la identificación de receptores, el polipéptido TAT marcado puede ligarse por fotoafinidad a preparaciones de membrana celular o de extracto que expresan la molécula receptora. El material reticulado se resuelve por PAGE y se expone a película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor puede escindirse, resolverse en fragmentos de péptidos y someterse a micro-secuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida de la micro-secuenciación se usaría para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degeneradas para cribar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el receptor putativo.

[0314] En otro ensayo para antagonistas, células de mamífero o una preparación de membrana que expresa el receptor se incubaría con el polipéptido TAT marcado en presencia del compuesto candidato. Entonces se mediría la capacidad del compuesto para potenciar o bloquear esta interacción.

[0315] Más ejemplos específicos de posibles antagonistas incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con polipéptido TAT y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos poli- y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos antiidiotípicos y versiones quiméricas o humanizadas de tales anticuerpos o fragmentos, además de anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un posible antagonista puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido TAT que reconoce el receptor, pero que no confiere efecto, inhibiendo así competitivamente la acción del polipéptido TAT.

[0316] Otro posible antagonista del polipéptido TAT es una construcción de ARN o ADN antisentido preparada usando tecnología antisentido en la que, por ejemplo, una molécula de ARN o ADN antisentido actúa para bloquear directamente la traducción de ARNm hibridándose con el ARNm elegido como diana y previniendo la traducción de proteínas. Puede usarse tecnología antisentido para controlar la expresión génica mediante la formación de una triple hélice o ADN o ARN antisentido, basándose ambos procedimientos en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la porción codificante de 5' de la secuencia de polinucleótidos, que codifica los polipéptidos TAT maduros en el presente documento, se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Un oligonucleótido de ADN se diseña para ser complementario a una región del gen que participa en la transcripción (triple hélice - véanse Lee y col., *Nucl. Acids Res.*, 6:3073 (1979); Cooney y col., *Science*, 241: 456 (1988); Dervan y col., *Science*, 251:1360 (1991)),

previniéndose así la transcripción y la producción del polipéptido TAT. El oligonucleótido de ARN antisentido se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido TAT (antisentido - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también pueden administrarse a células de forma que el ARN o ADN antisentido pueda expresarse *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido TAT. Si se usa ADN antisentido, se prefieren los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la traducción, por ejemplo, entre aproximadamente las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

[0317] Los posibles antagonistas incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio activo, el sitio de unión del receptor, o factor de crecimiento u otro sitio de unión relevante del polipéptido TAT, bloqueándose así la actividad biológica normal del polipéptido TAT. Ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos, preferentemente péptidos solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos de no peptidilo sintéticos.

[0318] Las ribozimas son moléculas de ARN enzimático que pueden catalizar la escisión específica de ARN. Las ribozimas actúan por hibridación específica de la secuencia con el ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Los sitios de escisión de ribozimas específicos dentro de una posible diana de ARN pueden identificarse por técnicas conocidas. Para más detalles véanse, por ejemplo, Rossi, Current Biology, 4:469-471 (1994), y la publicación PCT n° WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

[0319] Las moléculas de ácidos nucleicos en la formación de la triple hélice usadas para inhibir la transcripción deberían ser monocatenarias y compuestas por desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de forma que se promueva la formación de la triple hélice mediante las reglas de apareamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren estiramientos considerables de purinas o pirimidinas en una cadena de un dúplex. Para más detalles véase, por ejemplo, la publicación PCT n° WO 97/33551, arriba.

[0320] Estas moléculas pequeñas pueden identificarse por uno cualquiera o más de los ensayos de cribado tratados anteriormente en el presente documento y/o por cualquier otra técnica de cribado muy conocida para aquellos expertos en la materia.

[0321] El ácido nucleico que codifica el polipéptido TAT aislado puede usarse en el presente documento para producir recombinantemente polipéptido TAT usando técnicas muy conocidas en la técnica y como se describen en el presente documento. A su vez, los polipéptidos TAT producidos pueden emplearse para generar anticuerpos anti-TAT usando técnicas muy conocidas en la técnica y como se describen en el presente documento.

[0322] Los anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido TAT identificado en el presente documento, además de otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado desvelados anteriormente en el presente documento, pueden administrarse para el tratamiento de diversos trastornos, que incluyen cáncer, en forma de composiciones farmacéuticas.

[0323] Si el polipéptido TAT es intracelular y se usan anticuerpos completos como inhibidores, se prefieren anticuerpos de internalización. Sin embargo, también pueden usarse lipofecciones o liposomas para administrar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, a células. Si se usan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en la secuencias de la región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas de péptido que retienen la capacidad de unirse a la secuencia de proteína diana. Tales péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse por tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

[0324] La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Alternativamente o además, la composición puede comprender un agente que potencia su función tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citocina, agente quimioterapéutico o agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

[0325] Los siguientes ejemplos se ofrecen sólo para fines ilustrativos, y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

[0326] Los reactivos comercialmente disponibles mencionados en los ejemplos se usaron según instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. La fuente de aquellas células identificadas en los siguientes ejemplos, y en toda la memoria descriptiva, por los números de acceso de ATCC es la Colección americana de cultivos tipo, Manassas, VA.

EJEMPLO 1: Perfilado de expresión de tejido usando GeneExpress®

[0327] Una base de datos patentada que contiene información de la expresión génica (GeneExpress®, Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD) se analizó en un intento por identificar polipéptidos (y sus ácidos nucleicos codificantes) cuya expresión estuviera significativamente regulada por incremento en tejido(s) tumoral(es) particular(es) de interés con respecto a otro(s) tumor(es) y/o tejidos normales. Específicamente, el análisis de la base de datos GeneExpress® se realizó usando tanto software disponible por Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD, para su uso con la base de datos GeneExpress® como software patentado escrito y desarrollado en Genentech, Inc. para su uso con la base de datos GeneExpress®. La evaluación de acontecimientos positivos en el análisis se basa en varios criterios que incluyen, por ejemplo, especificidad por tejido, especificidad por tumor y nivel de expresión en tejidos esenciales normales y/o proliferantes normales. Lo siguiente es una lista de moléculas cuyos perfiles de expresión de tejido como se determina a partir de un análisis de la base de datos GeneExpress® evidencia la alta expresión de tejido y la significativa regulación por incremento de la expresión en un tumor o tumores específicos con respecto a otros(s) tumor(es) y/o tejidos normales y opcionalmente la expresión relativamente baja en tejidos esenciales normales y/o proliferantes normales. Como tales, las moléculas enumeradas a continuación son dianas de polipéptidos excelentes para el diagnóstico y la terapia del cáncer en mamíferos.

Molécula	regulación por incremento de la expresión en:	con respecto a:
ADN234441 (TAT201)	tumor de colon	tejido de colon normal
ADN234441 (TAT201)	tumor de recto	tejido de recto normal

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

[0328] En este ensayo se usó un ensayo de 5'-nucleasa (por ejemplo, TaqMan®) y PCR cuantitativa en tiempo real (por ejemplo, ABI Prism 7700 Sequence Detection System® (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA)) para encontrar genes que estaban significativamente expresados en exceso en un tumor o tumores cancerosos con respecto a otros tumores cancerosos o tejido no canceroso normal. La reacción del ensayo de 5'-nucleasa es una técnica basada en PCR fluorescente que hace uso de la actividad de la 5'-exonucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa para monitorizar la expresión génica en tiempo real. Dos cebadores de oligonucleótidos (cuyas secuencias se basan en el gen o secuencia EST de interés) se usan para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, se diseña para detectar la secuencia de nucleótidos localizada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extensible por la enzima Taq ADN polimerasa, y está marcada con un colorante fluorescente indicador y un colorante fluorescente extintor. Cualquier emisión inducida por láser del colorante indicador es inactivada por el colorante extintor cuando los dos colorantes se localizan juntos como cuando están sobre la sonda. Durante la amplificación por reacción de PCR, la enzima Taq ADN polimerasa escinde la sonda de un modo dependiente del molde. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian en disolución, y la señal del colorante indicador liberado está libre del efecto extintor del segundo fluoróforo. Una molécula de colorante indicador es liberada para cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante indicador sin extinguir proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

[0329] El procedimiento de 5'-nucleasa se ejecuta en un dispositivo de PCR cuantitativa en tiempo real tal como ABI Prism 7700™ Sequence Detection. El sistema consiste en un termociclador, láser, cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) y ordenador. El sistema amplifica muestras en una forma de 96 pocillos sobre un termociclador. Durante la amplificación, la señal de fluorescencia inducida por láser se recoge en tiempo real por cables de fibra óptica para los 96 pocillos, y se detecta en el CCD. El sistema incluye software para ejecutar el instrumento y para analizar los datos.

[0330] El material de partida para el cribado fue ARNm aislado de una variedad de tejidos cancerosos diferentes. El ARNm se cuantifica con exactitud, por ejemplo, fluorométricamente. Como control negativo, el ARN se aisló de diversos tejidos normales del mismo tipo de tejido que los tejidos cancerosos que se prueban.

[0331] Los datos del ensayo de 5'-nucleasa se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo umbral. Éste se define como ciclo al que la señal indicadora se acumula por encima del nivel de referencia de la fluorescencia. Los valores de ΔCt se usan como medición cuantitativa del número relativo de copias iniciales de una secuencia diana particular en una muestra de ácido nucleico cuando se comparan resultados de ARNm de cáncer con resultados de

ARNm humano normal. Como una unidad de Ct se corresponde con 1 ciclo de PCR o aproximadamente un aumento relativo de 2 veces con respecto al normal, dos unidades se corresponden con un aumento relativo de 4 veces, 3 unidades se corresponden con un aumento relativo de 8 veces, etc., puede medirse cuantitativamente el aumento en veces relativo en la expresión de ARNm entre dos o más tejidos diferentes. Usando esta técnica, las moléculas enumeradas a continuación se han identificado como que se expresan significativamente en exceso en tumor(es) particular(es) con respecto a sus tejido(s) homólogo(s) no canceroso(s) normal(es) (tanto del mismo donante de tejido como de donantes de tejido diferentes) y, por tanto, representan dianas de polipéptidos excelentes para el diagnóstico y la terapia del cáncer en mamíferos.

<u>Molécula</u>	<u>regulación por incremento de la expresión en:</u>	<u>con respecto a:</u>
ADN234441 (TAT701)	tumor de colon	tejido de colon normal

EJEMPLO 4: Hibridación *in situ*

[0332] La hibridación *in situ* es una técnica potente y versátil para la detección y localización de secuencias de ácidos nucleicos dentro de preparaciones de células o tejidos. Puede ser útil, por ejemplo, para identificar sitios de expresión génica, analizar la distribución de tejido de la transcripción, identificar y localizar infección vital, seguir cambios en la síntesis de ARNm específico y ayudar en el mapeo de cromosomas.

[0333] La hibridación *in situ* se realizó siguiendo una versión optimizada del protocolo por Lu y Gillett, Cell Vision 1:169-176(1994), usando ribosondas marcadas con ³³P generadas por PCR. Brevemente, tejidos humanos incorporados en parafina fijados en formalina se seccionaron, desparafinaron, desproteínaron en proteinasa K (20 g/ml) durante 15 minutos a 37°C, y adicionalmente se procesaron para la hibridación *in situ* como se describe por Lu y Gillett, arriba. Una ribsonda antisentido marcada con [³³P] UTP se generó a partir de un producto de PCR y se hibridó a 55°C durante la noche. Los portaobjetos se sumergieron en emulsión de seguimiento nuclear Kodak NTB2 y se expusieron durante 4 semanas.

Síntesis de ³³P-ribsonda

[0334] 6,0 µl (125 mCi) de ³³P-UTP (Amersham BF 1002, SA<2000 Ci/mmol) se secaron en Speed vac. A cada tubo que contenía ³³P-UTP seco se añadieron los siguiente componentes:

- 2,0 µl de 5x tampón de transcripción
- 1,0 µl de DTT (100 mM)
- 2,0 µl de mezcla de NTP (2,5 mM: 10 µ; cada uno de GTP, CTP y ATP 10 mM + 10 µl de H₂O)
- 1,0 µl de UTP (50 µM)
- 1,0 µl de Rnasin
- 1,0 µl de molde de ADN (1 µg)
- 1,0 µl de H₂O
- 1,0 µl de ARN polimerasa (para los productos de PCR T3 = AS, T7 = S, normalmente)

[0335] Los tubos se incubaron a 37°C durante una hora. Se añadió 1,0 µl de RQ1 ADNsa, seguido de incubación a 37°C durante 15 minutos. Se añadieron 90 µl de TE (Tris 10 mM a pH 7,6/EDTA 1 mM a pH 8,0), y la mezcla se pipeteó sobre papel DE81. La disolución restante se cargó en una unidad de ultrafiltración Microcon-50 y se centrifugó usando el programa 10 (6 minutos). La unidad de filtración se invirtió sobre un segundo tubo y se centrifugó usando el programa 2 (3 minutos). Después de la centrifugación de recuperación final se añadieron 100 µl de TE. 1 µl del producto final se pipeteó sobre papel DE81 y se contó en 6 ml de Biofluor II.

[0336] La sonda se ejecutó sobre un gel de TBE/urea. Se añadieron 1-3 µl de la sonda o 5 µl de ARN Mrk III a 3 µl de tampón de carga. Después de calentar sobre un bloque térmico a 95°C durante tres minutos, la sonda se situó inmediatamente sobre hielo. Los pocillos de gel se lavaron, la muestra se cargó y se ejecutó a 180-250 voltios durante 45 minutos. El gel se envolvió en envoltorio de saran y se expuso a película de XAR con una pantalla intensificadora en congelador a -70°C una hora hasta toda la noche.

Hibridación de ³³P

A. Pretratamiento de secciones congeladas

[0337] Los portaobjetos se sacaron del congelador, se dispusieron sobre bandejas de aluminio y se descongelaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las bandejas se dispusieron en la estufa de incubación a 55°C durante cinco minutos para reducir la condensación. Los portaobjetos se fijaron durante 10 minutos en 4% de paraformaldehído sobre hielo en la campana extractora y se lavaron en 0,5 x SSC durante 5 minutos, a temperatura

ambiente (25 ml de 20 x SSC + 975 ml de SQ H₂O). Después de la desproteínación en 0,5 µg/ml de proteinasa K durante 10 minutos a 37°C (12,5 µl de 10 mg/ml de disolución madre en 250 ml de tampón ARNsa libre de ARNsa precalentada), las secciones se lavaron en 0,5 x SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se deshidrataron en etanol del 70%, 95%, 100% 2 minutos cada vez.

5 **B. Pretratamiento de secciones incorporadas en parafina**

10 **[0338]** Los portaobjetos se desparafinaron, se dispusieron en SQ H₂O y se aclararon dos veces en 2 x SSC a temperatura ambiente durante 5 minutos cada vez. Las secciones se desproteínaron en 20 µg/ml de proteinasa K (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón ARNsa libre de ARNsa, 37°C, 15 minutos) - embrión humano, o 8 x proteinasa K (100 µl en 250 ml de tampón ARNasa, 37°C, 30 minutos) - tejidos en formalina. El posterior aclarado en 0,5 x SSC y la deshidratación se realizaron como se ha descrito anteriormente.

15 **C. Prehibridación**

[0339] Los portaobjetos se dispusieron en una caja de plástico revestida con tampón Box (4 x SSC, 50% de formamida) - papel de filtro saturado.

20 **D. Hibridación**

[0340] 1,0 x 10⁶ cpm de sonda y 1,0 µl de ARNt (50 mg/ml de disolución madre) por portaobjetos se calentaron a 95°C durante minutos. Los portaobjetos se enfriaron sobre hielo y se añadieron 48 µl de tampón de hibridación por portaobjetos. Después de agitar con vórtex se añadieron 50 µl de mezcla de ³³P a 50 µl de prehibridación sobre el portaobjetos. Los portaobjetos se incubaron durante la noche a 55°C.

25 **E. Lavados**

30 **[0341]** El lavado se hizo 2 x 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a temperatura ambiente (400 ml de 20 x SSC + 16 ml de EDTA 0,25 M, V_f= 4 l), seguido de tratamiento con ARNasa a 37°C durante 30 minutos (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón ARNasa = 20 µg/ml). Los portaobjetos se lavaron 2 x 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a temperatura ambiente. La rigurosidad de las condiciones de lavado fue del siguiente modo: 2 horas a 55°C, 0,1 x SSC, EDTA (20 ml de 20 x SSC + 16 ml de EDTA, V_f= 4 l).

35 **F. Oligonucleótidos**

[0342] El análisis *in situ* se realizó en una variedad de secuencias de ADN desveladas en el presente documento. Los oligonucleótidos empleados para estos análisis se obtuvieron de manera que fueran complementarios a los ácidos nucleicos (o los complementos del mismo) como se muestra en las figuras adjuntas.

40 **G. Resultados**

[0343] El análisis *in situ* se realizó en una variedad de secuencias de ADN desveladas en el presente documento. Los resultados de estos análisis son del siguiente modo.

45 **ADN234441 (TAT201)**

50 **[0344]** La expresión débil (e incoherente) se observa en riñón normal, mucosa de colon normal y vesícula biliar normal. La expresión débil a moderada, aunque algo incoherente, se observa en mucosa gastrointestinal normal (esófago, estómago, intestino delgado, colon, ano). La expresión significativa en tumores se observa del siguiente modo: 11 de 12 adenocarcinomas colorrectales, 4 de 4 adenocarcinomas gástricos, 6 de 8 adenocarcinomas metastásicos, 4 de 4 cánceres de esófago y 1 de 2 adenocarcinomas pancreáticos.

EJEMPLO 6: Uso de TAT como sonda de hibridación

55 **[0345]** El siguiente procedimiento describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica TAT como sonda de hibridación para, es decir, el diagnóstico de la presencia de un tumor en un mamífero.

60 **[0346]** El ADN que comprende la secuencia codificante de TAT de longitud completa o madura como se desvela en el presente documento también puede emplearse como sonda para cribar ADN homólogos (tales como aquellos que codifican variantes de TAT que se producen naturalmente) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano.

[0347] La hibridación y el lavado del filtro que contiene ambos ADN de la biblioteca se realiza bajo las siguientes condiciones de alta rigurosidad. La hibridación de sonda derivada de TAT radiomarcado con los filtros se realiza en una disolución de 50% de formamida, 5 x SSC, 0,1% de SDS, 0,1% de pirofosfato de sodio, fosfato de sodio 50 mM, pH 6,8, 2x disolución de Denhardt y 10% de sulfato de dextrano a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una disolución acuosa de 0,1 x SSC y 0,1% de SDS a 42°C.

[0348] Los ADN que tienen una identidad de secuencias deseada con el ADN que codifica TAT de la secuencia nativa de longitud completa pueden luego identificarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

EJEMPLO 7: Expresión de TAT en *E. coli*

[0349] Este ejemplo ilustra la preparación de una forma sin glucosilar de TAT por expresión recombinante en *E. coli*.

[0350] La secuencia de ADN que codifica TAT se amplifica inicialmente usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deben contener sitios de enzimas de restricción que se corresponden con los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Puede emplearse una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolivar y col., Gene, 2:95 (1977)) que contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina. El vector se digiere con enzima de restricción y se desfosforila. Entonces, las secuencias amplificadas por PCR se ligan en el vector. El vector incluirá preferentemente secuencias que codifican un gen de resistencia a antibiótico, un promotor trp, un líder de poli-His (incluyendo los seis primeros codones de STII, secuencias de poli-His y sitio de escisión de enterocinas), la región codificante de TAT, el terminador de la transcripción lambda y un gen argU.

[0351] Entonces, la mezcla de ligación se usa para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada usando los procedimientos descritos en Sambrook y col., arriba. Los transformantes se identifican por su capacidad para cultivarse en placas LB y luego se seleccionan colonias resistentes a antibiótico. El ADN de plásmido puede aislarse y confirmarse por análisis de restricción y secuenciación de ADN.

[0352] Los clones seleccionados pueden cultivarse durante la noche en medio de cultivo líquido tal como caldo LB complementado con antibióticos. El cultivo durante la noche puede usarse posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. Entonces, las células se cultivan a una densidad óptica deseada, durante lo cual se activa el promotor de la expresión.

[0353] Después de cultivar las células durante varias horas más, las células pueden recogerse por centrifugación. El sedimento de células obtenido por la centrifugación puede solubilizarse usando diversos agentes conocidos en la técnica, y la proteína TAT solubilizada puede luego purificarse usando una columna quelante de metales en condiciones que permiten la estrecha unión de la proteína.

[0354] TAT puede expresarse en *E. coli* en una forma marcada con poli-His usando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica TAT es inicialmente amplificado usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de enzimas de restricción que se corresponden con los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que se proporcionan para la eficiente y fidedigna iniciación de la traducción, rápida purificación sobre una columna de quelación de metales y eliminación proteolítica con enterocinas. Entonces, las secuencias marcadas con poli-His amplificadas por PCR se ligan en un vector de expresión, que se usa para transformar un huésped de *E. coli* basándose en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Los transformantes se cultivan primero en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C con agitación hasta que se alcanza una D.O. a 600 de 3-5. Entonces, los cultivos se diluyen 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato de sodio-2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Hy-Case SF de Sheffield en 500 ml de agua, además de MPOS 110 mM, pH 7,3, 0,55% (peso/volumen) de glucosa y MgSO₄ 7 mM) y se cultivan durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Las muestras se eliminan para verificar la expresión por análisis de SDS-PAGE y el cultivo en masa se centrifuga para sedimentar las células. Los sedimentos de células se congelan hasta la purificación y el replagamiento.

[0355] Pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,3 a 1 l (gránulos de 6-10 g) se suspende en 10 volúmenes (peso/volumen) en guanidina 7 M, Tris 20 mM, tampón pH 8. Se añade sulfito de sodio sólido y tetratiónato de sodio para preparar concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la disolución se agita durante la noche a 4°C. Esta etapa produce una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por sulfitolización. La disolución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna de quelato metálico (guanidina 6 M, Tris 20 mM,

pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micrómetros para clarificar. El extracto clarificado se carga sobre una columna de quelato metálico de Qiagen Ni-NTA de 5 ml equilibrada en el tampón de columna de quelato metálico. La columna se lava con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, calidad Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada se reúnen y se guardan a 4°C. La concentración de proteína se estima por su absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de extinción calculado basándose en su secuencia de aminoácidos.

[0356] Las proteínas se repliegan diluyendo la muestra lentamente en tampón de replegado recientemente preparado que consiste en Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de replegamiento se eligen de manera que la concentración final de proteína esté entre 50 y 100 microgramos/ml. La disolución de replegamiento se agita cuidadosamente a 4°C durante 12-36 horas. La reacción de replegamiento se inactiva mediante la adición de TFA a una concentración final del 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de purificarse más la proteína, la disolución se filtra a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se añade acetonitrilo al 2-10% de concentración final. La proteína replegada se purifica por cromatografía sobre una columna de fase inversa Poros R1/H usando un tampón móvil del 0,1% de TFA con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80%. Las alícuotas de fracciones con absorbancia A280 se analizan sobre geles de SDS-poliacrilamida y se reúnen las fracciones que contienen proteína replegada homogénea. Generalmente, las especies apropiadamente replegadas de la mayoría de las proteínas se eluyeron a las menores concentraciones de acetonitrilo, ya que aquellas especies son las más compactas con sus interiores hidrófobos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas se eluyen normalmente a mayores concentraciones de acetonitrilo. Además de resolver formas de plegamiento inadecuado de proteínas a partir de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina endotoxina de las muestras.

[0357] Las fracciones que contienen el polipéptido TAT plegado deseado se reúnen y el acetonitrilo se elimina usando una corriente suave de nitrógeno dirigida en la disolución. Las proteínas se formulan en HEPES 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y 4% de manitol por diálisis o por filtración en gel usando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y esterilizadas por filtración.

[0358] Ciertos de los polipéptidos TAT desvelados en el presente documento se han expresado y purificado satisfactoriamente usando esta(s) técnica(s).

EJEMPLO 8: Expresión de TAT en células de mamífero

[0359] Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glucosilada de TAT por expresión recombinante en células de mamífero.

[0360] El vector pRKS (véase el documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989) se emplea como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN de TAT está ligado en pRKS con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de TAT usando procedimientos de ligación tal como se describen en Sambrook y col., arriba. El vector resultante se llama pRKS.TAT.

[0361] En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Se cultivan células 293 humanas (ATCC CCL 1573) a confluencia en placas de cultivo de tejido en medio tal como DMEM complementado con suero bovino fetal y opcionalmente componentes nutritivos y/o antibióticos. Aproximadamente 10 µg de ADN de pRKS-TAT se mezclan con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen de ARN de VA [Thimmappaya y col., Cell, 31:543 (1982)] y se disuelven en 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl₂ 0,227 M. A esta mezcla se añaden, gota a gota, 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO₄ 1,5 mM, y se permite que se forme un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se deja que sedimenten durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se elimina por aspiración y se añaden 2 ml de 20% de glicerol en PBS durante 30 segundos. Entonces, las células 293 se lavan con medio libre de suero, se añade medio fresco y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

[0362] Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se elimina y se sustituye con medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml de ³⁵S-cisteína y 200 µCi/ml de ³⁵S-metionina. Después de una incubación de 12 horas, el medio acondicionado se recoge, se concentra en un filtro de centrifuga y se carga sobre 15% de gel de SDS. El gel procesado puede secarse y exponerse a película durante un periodo de tiempo seleccionado para revelar la presencia del polipéptido TAT. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden someterse adicionalmente a incubación (en medio libre de suero) y el medio se prueba en bioensayos seleccionados.

[0363] En una técnica alternativa, TAT puede introducirse transitoriamente en células 293 usando el procedimiento de sulfato de dextrano descrito por Sompariyac y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). Se

cultivan células 293 a densidad máxima en una matriz de centrifuga y se añaden 700 µg de ADN de pRKS-TAT. Las células se concentran primero a partir del matraz de centrifuga por centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incuba sobre el sedimento de células durante cuatro horas. Las células se tratan con 20% de glicerol durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido y se reintroducen en el matraz de centrifuga que contiene medio de cultivo de tejido, 5 µg/ml de insulina bovina y 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar células y residuos. La muestra que contiene TAT expresado puede luego concentrarse y purificarse por cualquier procedimiento seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna.

[0364] En otra realización, TAT puede expresarse en células CHO. pRKS-TAT puede transfectarse en células CHO usando reactivos conocidos tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio sustituirse con medio de cultivo (solo) o medio que contiene una radiomarca tal como ³⁵S-metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido TAT, el medio de cultivo puede reemplazarse con medio libre de suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días, y luego se recoge el medio acondicionado. El medio que contiene TAT expresado puede luego concentrarse y purificarse por cualquier procedimiento seleccionado.

[0365] TAT marcado con epítipo también puede expresarse en células CHO huésped. TAT puede subclonarse fuera del vector pRK5. El inserto del subclon puede someterse a PCR para fusionarse en marco con una marca seleccionada de epítipo tal como una marca de poli-His en un vector de expresión de baculovirus. El inserto de TAT marcado con poli-His puede luego subclonarse en un vector accionado por SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para la selección de clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (como se ha descrito anteriormente) con el vector accionado por SV40. El marcado puede realizarse, como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene TAT marcado con poli-His expresado puede luego concentrarse y purificarse por cualquier procedimiento seleccionado, tal como por cromatografía de afinidad por quelato de Ni²⁺.

[0366] TAT también puede expresarse en células CHO y/o COS por un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO por otro procedimiento de expresión estable.

[0367] La expresión estable en células CHO se realiza usando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción de IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes para las formas solubles (por ejemplo, dominios extracelulares) de las proteínas respectivas están fusionadas con una secuencia de la región constante I de IgG1 que contiene los dominios bisagra, CH2 y CH2 y/o es una forma marcada con poli-His.

[0368] Tras la amplificación por PCR, los ADN respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO usando técnicas convencionales como se describen en Ausubel y col., Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para tener sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés para permitir el barajado conveniente de ADNc. El vector de expresión usado en células CHO es como se describe en Lucas y col., Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779 (1996), y usa el promotor temprano/potenciador del SV40 para accionar la expresión del ADNc de interés y dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección del mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

[0369] Doce microgramos del ADN de plásmido deseado se introducen en aproximadamente 10 millones de células CHO usando reactivos de transfección comercialmente disponibles Superfect® (Qiagen), Dosper® o Fugene® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan como se describe en Lucas y col., arriba. Aproximadamente 3 x 10⁷ células se congelan en una ampolla para el crecimiento y la producción adicional como se describe a continuación.

[0370] Las ampollas que contienen el ADN de plásmido se descongelan colocando en baño de agua y se mezclan por agitación con vórtex. El contenido se pipetea en un tubo de centrifuga que contiene 10 ml de medio y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado en 0,2 µm con 5% de suero bovino fetal diafiltrado en 0,2 µm). Entonces, las células se toman en alícuotas en una centrifuga de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo: después de 1-2 días, las células se transfieren a una centrifuga de 250 ml cargada con 150 ml de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37°C. Después de otros 2-3 días, centrifugadoras de 250 ml, 500 ml y 2000 ml se siembran con 3 x 10⁵ células/ml. El medio de células se intercambia con medio fresco por centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque puede emplearse cualquier medio de CHO adecuado, actualmente puede usarse un medio de producción descrito en la patente de EE.UU. n° 5.122.469, concedida el 16 de junio de 1992. Una centrifuga de producción de 3 l se siembra a 1,2 x 10⁶ células/ml. En el día 0 se determina el número de células y el pH. En el día 1, la centrifuga se muestrea y comienza el burbujeo con aire filtrado. En el día 2, la centrifuga se muestrea, la temperatura se

desplaza a 33°C y se toman 30 ml de 500 g/l de glucosa y 0,6 ml de 10% de antiespumante (por ejemplo, 35% de emulsión de polidimetilsiloxano, Dow Corning 365, emulsión de calidad médica). Durante toda la producción, el pH se ajusta según sea necesario para mantenerlo a aproximadamente 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad cae por debajo del 70%, el cultivo celular se recoge por centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22 µm. El filtrado tanto se guardó a 4°C como se cargó inmediatamente sobre columnas para la purificación.

[0371] Para las construcciones marcadas con poli-His, las proteínas se purifican usando una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación se añade imidazol al medio acondicionado a una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea sobre una columna de 6 ml de Ni-NTA equilibrada en HEPES 20 mM, pH 7,4, tampón que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min a 4°C. Después de la carga, la columna se lava con tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrio que contiene imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene HEPES 10 mM, NaCl 0,14 M y 4% de manitol, pH 6,8, con una columna G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y se guarda a -80°C.

[0372] Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican a partir del medio acondicionado del siguiente modo. El medio acondicionado se bombea sobre una columna de proteína A de 5 ml (Pharmacia) que había sido equilibrada en tampón fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Después de la carga, la columna se lava exhaustivamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 µl de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en tampón de almacenamiento como se ha descrito anteriormente para las proteínas marcadas con poli-His. La homogeneidad se evalúa por geles de SDS-poliacrilamida y por secuenciación de aminoácidos del extremo N por degradación de Edman.

[0373] Ciertos de los polipéptidos TAT desvelados en el presente documento se han expresado y purificado satisfactoriamente usando esta(s) técnica(s).

EJEMPLO 9: Expresión de TAT en levadura

[0374] El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de TAT en levadura.

[0375] Primero, se construyen vectores de expresión de levadura para la producción o secreción intracelular de TAT del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica TAT y el promotor se insertan en sitios de enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de TAT. Para la secreción, el ADN que codifica TAT puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal de TAT nativo u otro péptido señal de mamífero o, por ejemplo, una señal secretora/secuencia líder de factor alfa o de invertasa de levadura, y secuencias de ligador (si se necesitan) para la expresión de TAT.

[0376] Células de levadura, tales como la cepa de levadura AB110, pueden luego transformarse con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con 10% de ácido tricloroacético y separación por SDS-PAGE, seguido de tinción de los geles con tinción con azul de Coomassie.

[0377] TAT recombinante puede aislarse y purificarse posteriormente eliminando las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y luego concentrando el medio usando filtros de cartucho seleccionados. El concentrado que contiene TAT puede purificarse adicionalmente usando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

[0378] Ciertos de los polipéptidos TAT desvelados en el presente documento han sido expresados y purificados satisfactoriamente usando esta(s) técnica(s).

EJEMPLO 10: Expresión de TAT en células de insecto infectadas con baculovirus

[0379] El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de TAT en células de insecto infectadas por baculovirus.

[0380] La secuencia que codifican TAT está fusionada en la dirección 5' de una marca de epítipo contenida dentro de un vector de expresión de baculovirus. Tales marcas de epítopos incluyen marcas de poli-His y marcas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Puede emplearse una variedad de plásmidos, que incluyen plásmidos derivados de plásmidos comercialmente disponibles tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica TAT o la porción deseada de la secuencia codificante de TAT, tal como la secuencia que codifica un dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la

proteína es extracelular, se amplifica por PCR con cebadores complementarios a las regiones de 5' y 3'. El cebador de 5' puede incorporar sitios de enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). Entonces, el producto se digiere con aquellas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

5 **[0381]** El baculovirus recombinante se genera por co-transfección del plásmido anterior y ADN de virus BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) usando lipofectina (comercialmente disponible de GIBCO-BRL). Después de 4 - 5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y se usan para amplificaciones adicionales. La infección vírica y la expresión de proteínas se realizan como se describe por O'Reilly y col., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

15 **[0382]** Entonces, TAT marcado con poli-His expresado puede purificarse, por ejemplo, por cromatografía de afinidad por quelato de Ni²⁺ del siguiente modo. Se preparan extractos a partir de células Sf9 infectadas con virus recombinante como se describe por Rupert y col., Nature, 362:175-179(1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en tampón de sonicación (HEPES 25 ml, pH 7,9; MgCl₂ 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; 10% de glicerol; 0,1% de NP-40; KCl 0,4 M) y se sonican dos veces durante 20 segundos sobre hielo. Los sonicados se aclaran por centrifugación y el sobrenadante se diluye 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, 10% de glicerol, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de Ni²⁺-NTA agarosa (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. El extracto de células filtradas se carga sobre la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava a la A₂₈₀ del nivel inicial con tampón de carga, en cuyo momento empieza la recogida de fracciones. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM, 10% de glicerol, pH 6,0), que eluye la proteína no específicamente unida. Después de alcanzar de nuevo el nivel inicial de A₂₈₀, la columna se revela con un gradiente de imidazol del 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan por SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia Western con Ni²⁺-NTA-conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen TAT marcado con His₁₀ eluido se reúnen y se dializan contra tampón de carga.

30 **[0383]** Alternativamente, la purificación de TAT marcado con IgG (o marcado con Fc) puede realizarse usando técnicas cromatográficas conocidas que incluyen, por ejemplo, cromatografía en columna de proteína A o proteína G.

35 **[0384]** Ciertos de los polipéptidos TAT desvelados en el presente documento han sido satisfactoriamente expresados y purificados usando esta(s) técnica(s).

EJEMPLO 11: Preparación de anticuerpos que se unen a TAT

40 **[0385]** Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a TAT.

45 **[0386]** Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Goding, arriba. Los inmunógenos que pueden emplearse incluyen TAT purificado, proteínas de fusión que contienen TAT y células que expresan TAT recombinante sobre la superficie celular. El experto puede hacer la selección del inmunógeno sin experimentación adicional.

50 **[0387]** Ratones, tales como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno TAT emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyectan subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de las patas traseras del animal. Entonces, los ratones inmunizados se refuerzan 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. Después, durante varias semanas, los ratones también pueden reforzarse con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero pueden obtenerse periódicamente de los ratones por sangrado retro-orbital para probar en ensayos de ELISA para detectar anticuerpos anti-TAT.

55 **[0388]** Después de detectarse un título de anticuerpos adecuado, los animales "positivos" para los anticuerpos pueden inyectarse con una inyección intravenosa final de TAT. Tres a cuatro días después, los ratones se sacrifican y se recogen las células del bazo. Entonces, las células del bazo se fusionan (usando 35% de polietilenglicol) con una línea de células de mieloma murino seleccionada tal como P3X63AgU.1, disponible de ATCC n° CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que luego pueden sembrarse en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células del bazo.

60

[0389] Las células de hibridoma se cribarán en un ELISA para reactividad contra TAT. La determinación de células de hibridoma “positivas” que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra TAT está dentro de la habilidad en la materia.

5 **[0390]** Las células de hibridoma positivas pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones Balb/c singéneos para producir ascitis que contiene los anticuerpos monoclonales anti-TAT. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse en matraces de cultivo de tejido o botellas rotatorias. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en la ascitis puede llevarse a cabo usando precipitación con sulfato de amonio, seguida de cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente puede emplearse la cromatografía de
10 afinidad basada en la unión del anticuerpo a proteína A o proteína G.

EJEMPLO 12: Purificación de polipéptidos TAT usando anticuerpos específicos

15 **[0391]** Polipéptidos TAT nativos o recombinantes pueden purificarse mediante una variedad de técnicas convencionales en la materia de la purificación de proteínas. Por ejemplo, polipéptido pro-TAT, polipéptido TAT maduro o polipéptido pre-TAT se purifican por cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido TAT de interés. En general, una columna de inmunoafinidad se construye acoplado covalentemente el anticuerpo anti-polipéptido TAT con una resina cromatográfica activada.

20 **[0392]** Se preparan inmunoglobulinas policlonales a partir de sueros inmunes tanto por precipitación con sulfato de amonio como por purificación sobre proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Asimismo, se preparan anticuerpos monoclonales a partir de líquido ascítico de ratón por precipitación con sulfato de amonio o cromatografía sobre proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica tal como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB
25 Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava según las instrucciones del fabricante.

30 **[0393]** Una columna de inmunoafinidad tal se utiliza en la purificación de polipéptido TAT preparando una fracción de células que contienen polipéptido TAT en una forma soluble. Esta preparación se deriva por solubilización de la célula completa o de una fracción subcelular obtenida por centrifugación diferencial mediante la adición de detergente o por otros procedimientos muy conocidos en la técnica. Alternativamente, el polipéptido TAT soluble que contiene una secuencia señal puede secretarse en cantidad útil en el medio en el que las células se cultivan.

35 **[0394]** Una preparación que contiene polipéptido TAT soluble se pasa por una columna de inmunoafinidad, y la columna se lava en condiciones que permiten la absorción preferencial del polipéptido TAT (por ejemplo, tampones de alta fuerza iónica en presencia de detergente). Entonces, la columna se eluye en condiciones que rompen la unión anticuerpo/polipéptido a TAT (por ejemplo, un tampón de bajo pH tal como aproximadamente pH 2-3, o una alta concentración de un caótropro tal como urea o ión tiocianato) y se recoge el polipéptido TAT.
40

EJEMPLO 13: Ensayo de destrucción de células tumorales *in vitro*

45 **[0395]** Células de mamífero que expresan el polipéptido TAT de interés pueden obtenerse usando técnicas de vectores de expresión y clonación convencionales. Alternativamente, muchas líneas celulares tumorales que expresan polipéptidos TAT de interés están públicamente disponibles, por ejemplo, por la ATCC y pueden identificarse rutinariamente usando análisis de ELISA o FACS convencional. Los anticuerpos monoclonales anti-polipéptido TAT (y derivados conjugados con toxina de los mismos) pueden luego emplearse en ensayos para determinar la capacidad del anticuerpo para destruir el polipéptido TAT que expresa células *in vitro*.

50 **[0396]** Por ejemplo, las células que expresan el polipéptido TAT de interés se obtienen como se ha descrito anteriormente y se siembran en placas de 96 pocillos. En un análisis, el conjugado anticuerpo/toxina (o anticuerpo desnudo) se incluye durante la incubación de células durante un periodo de 4 días. En un segundo análisis independiente, las células se incuban durante 1 hora con el conjugado de anticuerpo/toxina (o anticuerpo desnudo) y luego se lavan y se incuban en ausencia de conjugado de anticuerpo/toxina durante un periodo de 4 días. Entonces se mide la viabilidad celular usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (nº cat G7571). Células sin tratar sirven de control negativo.
55

EJEMPLO 14: Ensayo de destrucción de células tumorales *in vivo*

60 **[0397]** Para probar la eficacia de anticuerpos anti-polipéptido TAT monoclonales conjugados o sin conjugar, anticuerpo anti-TAT se inyecta intraperitonealmente en ratones sin pelo 24 horas antes de recibir las células promotoras del tumor subcutáneamente en el flanco. Las inyecciones de anticuerpo continúan dos veces por

semana para el resto del estudio. Entonces, el volumen de tumor se mide dos veces por semana.

5 **[0398]** El cesionario de la presente solicitud está de acuerdo con que si un cultivo de los materiales en depósito muere o se pierde o se destruye cuando se cultiva bajo condiciones adecuadas, los materiales se sustituirán inmediatamente tras la notificación por otros iguales. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para poner en práctica la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno según sus leyes de patente.

10 **[0399]** La anterior memoria descriptiva escrita se considera que es suficiente para permitir que un experto en la materia ponga en práctica la invención. La presente invención no tiene que limitarse en alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada esta prevista como una única ilustración de ciertos aspectos de la invención y cualquier construcción que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de la presente invención. El depósito de material en el presente documento no constituye una admisión de que la descripción descrita en el presente documento contenida sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni debe interpretarse como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de aquellas mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de la descripción anterior y se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido diana antigénica asociada a tumor 201 (TAT 201) de SEQ ID NO: 92 mostrada en la Figura 2 para su uso en un procedimiento de tratamiento inhibiendo el crecimiento de una célula de tumor de colon canceroso que expresa dicho polipéptido TAT 201, en el que el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti-TAT 201 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.
2. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido diana antigénica asociada a tumor 201 (TAT 201) de SEQ ID NO: 92 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor de colon canceroso que comprende células que expresan dicho polipéptido TAT en un mamífero, en el que el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti-TAT 201 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.
3. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido diana antigénica asociada a tumor 201 (TAT 201) de SEQ ID NO: 92 para su uso en un procedimiento de prevención o tratamiento de un trastorno proliferativo de colon asociado a un aumento de la expresión de dicho polipéptido TAT 201, en el que el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti-TAT 201 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.
4. Una composición farmacéutica para tratar un tumor de colon canceroso que expresa un polipéptido diana antigénica asociada a tumor 201 (TAT 201) de SEQ ID NO: 92, composición que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a dicho polipéptido TAT en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicho anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti-TAT y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición de la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-TAT 201.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición de la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo anti-TAT o fragmento de unión a antígeno del mismo está conjugado con un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico, por ejemplo, una toxina.
7. El anticuerpo o composición de la reivindicación 6, en el que dicha toxina está seleccionada del grupo que consiste en maitansinoide, caliqueamicina, isótopos radiactivos y enzimas nucleolíticas.
8. Uso de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido diana antigénica asociada a tumor 201 (TAT 201) de SEQ ID NO: 92 en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de una célula de tumor de colon canceroso que expresa dicho polipéptido TAT 201, en el que el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti-TAT 201 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.
9. Uso de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido diana antigénica asociada a tumor 201 (TAT 201) de SEQ ID NO: 92 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor de colon canceroso que comprende células que expresan dicho polipéptido TAT en un mamífero, en el que el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti-TAT 201 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.
10. Uso de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido diana antigénica asociada a tumor 201 (TAT 201) de SEQ ID NO: 92 en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de un trastorno proliferativo de colon asociado a un aumento de la expresión de dicho polipéptido TAT 201, en el que el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti-TAT 201 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.
11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el anticuerpo y uso son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
12. Un procedimiento de diagnosticar la presencia de un tumor de colon en un mamífero, en el que el procedimiento comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido TAT 201 de SEQ ID No. 92 (a) en una muestra de prueba de células de tejido de colon obtenidas de dicho mamífero, y (b) en una muestra de control de células no cancerosas normales conocidas del mismo origen o tipo de tejido, en el que un mayor nivel de expresión del polipéptido TAT 201 en la muestra de prueba, con respecto a la muestra de control, es indicativo de la presencia de tumor de colon en el mamífero del que se obtuvo la muestra de prueba.

13. Un procedimiento de diagnosticar la presencia de un tumor en un mamífero, en el que el procedimiento comprende (a) poner en contacto una muestra de prueba que comprende células de tejido obtenidas del mamífero con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un polipéptido TAT 201 de SEQ ID No. 92 y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y un polipéptido TAT 201 de SEQ ID No. 92 en la muestra de prueba, en el que la formación de un complejo es indicativa de la presencia de un tumor de colon en el mamífero.
- 5
14. El procedimiento de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado detectablemente.
- 10
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está unido a un soporte sólido

FIGURA 1

GCATGGAAGTCTTTATTTGAGCCCCTTAGCTGATGTGGAATCAGAAGAGCAAAAAGGTCATCTTCAGAGTGGC
 CTGGGCTGGGTCTTTTCTCTCCAGGATAGAAAAGTGGTGGTCACTTTATCCCTAGTAGACATGCTGCTGGGCT
 TTATCGCCCCAGCATTCCCATCCCCCFCAGAGCCCCTGTCACTCCAGACCAGCGAGTGTGGGCCTTTATCTGG
 ACTCTGCTTCCCTCCCTGGGGACACCAGGTCTTGGAGCAAGAGAACTTGGCAGGCTCTCCCCATGGCAGTCTTAT
 TCCTCCTCCTGTTCTATGTGGAACCCCCAGGCTGCAGACAACATGCAGGCCATCTATGTGGCCTTGGGGGAG
 GCAGTAGAGCTGCCATGTCCCTCACCACCTACTCTACATGGGGACGAACACCTGTCAATGGTTCTGCAGCCCTGC
 AGCAGGCTCCTTCACCACCCTGGTAGCCCAAGTCCAAGTGGGCAGGCCAGCCCCAGACCCTGGAAAACCAGGAA
 GGGAAATCCAGGCTCAGACTGCTGGGGAATATTCTTTGTGGTTGGAGGGATCCAAAGAGGAAGATGCCGGGCGG
 TACTGGTGCCTGTGCTAGGTCAGCACCACAACACTACCAGAACTGGAGGGTGTACGACGCTTGGTGCCTAAAGG
 ATCCCAGTTATCTGCAAGGGCTGCAGATGGATCCCCCTGCAATGTCTCCTGTGCTCTGTGGTCCCCAGCAGAC
 GCATGGACTCTGTGACCTGGCAGGAAGGGAAGGGTCCCCTGAGGGGCCGTGTTTCAGTCCCTTCTGGGGCAGTGA
 GCTGCCCTGCTCTTGGTGTGCTCCTGGGGAGGGGCTTTCTGAGCCCAGGAGCCGAAGACCAAGAATCATCCGCTG
 CCTCATGACTCACAACAAAGGGGTGAGCTTTAGCCTGGCAGCCTCCATCGATGCTTCTCCTGCCCTCTGTGCC
 CTTCCACGGGCTGGGACATGCCTTGGATTCTGATGCTGCTGCTCACAATGGGCCAGGGAGTTGTCATCCTGGCC
 CTCAGCATCGTGTCTTGGAGGCAGAGGGTCCGTGGGGCTCCAGGCAGAGGAAACCGAATGCGGTGCTACAACCTG
 TGGTGAAGCCCCAGCAGTTCTTGCAAAGAGGCCGTGACCACCTGTGGCGAGGGCAGACCCCAGCCAGGCCCTGG
 AACAGATCAAGCTACCTGGAAACCCCCAGTGACCTTGATTACCAACATCCAGCCTGCGTCCGAGCCCATCAT
 TGCAATCAAGTGGAGACAGAGTCGGTGGGAGACGTGACTTATCCAGCCACAGGGACTGCTACCTGGGAGACCT
 GTGCAACAGCGCCGTGGCAAGCCATGTGGCCCTGCAGGCATTTTGGCTGCAGCAGCTACCGCCCTGACCTGTC
 TCTTGCCAGGACTGTGGAGCGGATAGGGGGAGTAGGAGTAGAGGAGGAAACAAGGGAGCAAGGGAACAAGGGAC
 ATCTGAACATCTAATGTGAGAAGAGAAACATCCTTCTGTGAGTCATTAATCTATGAACCACTCT

FIGURA 2

**MAVLFLLFLCGTPOAADNMQAIYVALGEAVELPCPSPTLHGDEHLSWFCSPAAGSFTTLVAQVQVGRPAPDP
GKPGRESRLRLLLGNYSLWLEGSKEEDAGRYWCAVLGQHHNYQNWRVYDVLVLKGSQLSARAADGSPCNVLLCSV
VPSRRMDSVTWQEGKGPVGRVQSFWGSEALLLVCPGEGELSEPRSRRPRIIRCLMTHNKGVSFSLAASIDASP
ALCAPSTGWDMPWILMLLLTMGQGVVILALSIVLWRQVRGAPGRGNMRCYNCGGSPSSSCKEAVTTCGEGRP
QPGLEQIKLPGNPPVTLIHQHPACVAAHHCNQVETESVGDVITYPAHRDCYLGDL CNSAVASHVAPAGILAAAAT
ALTCLLPGLWSG**

**Secuencia señal.
aminoácidos 1-15**

**Dominios transmembrana.
aminoácidos 234-254, 354-374**

**Sitio de N-glicosilación.
aminoácidos 88-91**

**Sitio de fosforilación de tirosina cinasa.
Aminoácidos 97-104**

**Sitios de N-miristoilación.
aminoácidos 12-17, 56-61, 110-115, 128-133, 138-143, 175-180, 209-214,
277-282, 278-283, 363-368**